

*Postverlagsort Berlin*

# ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN  
KIEL

B. SCHARRER  
NEW YORK

J. SEILER  
ZÜRICH

53. BAND, 4. HEFT

MIT 104 TEXTABBILDUNGEN, DAVON 1 FARBIGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 9. FEBRUAR 1961)



SPRINGER-VERLAG  
BERLIN • GÖTTINGEN • HEIDELBERG  
1961

Z.  
Zellforsch.

Preis DM 46.80

# Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von R. Goldschmidt und W. von Möllendorff. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von W. von Möllendorff und J. Seiler, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1943—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von Max Schultze; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von v. La Valette St. George, W. Waldeyer; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von W. Roux, H. Braus, H. Spemann.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

## Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319  
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

### 53. Band

### Inhaltsverzeichnis

### 4. Heft Seite

FERNANDES, M. V., and C. M. POMERAT, Cytopathogenic effects of rabies virus on nervous tissue <i>in vitro</i> . With 15 Figures in the Text, one of which in Colour . . . . .	431
TANAKA, K., Zur polarisationsoptischen Analyse der Knochenlamellensysteme des Menschen. Mit 3 Textabbildungen . . . . .	438
HEITZ, E., Das lamellare Dünn-Dick-Muster der Chloroplasten von <i>Chlamydomonas</i> , <i>Euglena</i> , <i>Fucus</i> , <i>Vaucheria</i> . Mit 6 Textabbildungen . . . . .	444
EAKIN, R. M., W. B. QUAY, and J. A. WESTFALL, Cytochemical and cytological studies of the parietal eye of the lizard, <i>Sceloporus occidentalis</i> . With 18 Figures in the Text . . . . .	449
SANO, Y., und CH. IMAI, Über ein blutbildendes Organ in der Sella turcica des Riesensalamanders ( <i>Megalobatrachus japonicus</i> ). Mit 11 Textabbildungen . . . . .	471
DUBOIS, A. M., et A. GONET, Régénération des îlots de Langerhans, au cours de la correction du diabète expérimental du rat par brépheplastie pancréatique. Avec 6 Figures dans le Texte . . . . .	481
CONTI, G., Sur la morphologie des cellules nerveuses ganglionnaires sympathiques au cours de différentes maladies. (Maladie de Bürger, maladie de Raynaud, gelures, mégadolichocôlon). Avec 32 Figures dans le Texte . . . . .	492
BARGMANN, W., K. FLEISCHHAUER und A. KNOOP, Über die Morphologie der Milchsekretion. II. Zugleich eine Kritik am Schema der Sekretionsmorphologie. Mit 13 Textabbildungen . . . . .	545

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.



Laboratório de Cultura de Tecidos Calouste Gulbenkian do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisbon, Portugal, and Tissue Culture Laboratory, Dept. of Anatomy, University of Texas Medical Branch Galveston, Texas

## CYTOPATHOGENIC EFFECTS OF RABIES VIRUS ON NERVOUS TISSUE *IN VITRO*\*

By

MÁRIO V. FERNANDES and C. M. POMERAT

With 15 Figures in the Text, one of which in Colour

(Received June 27, 1960)

While it has not been essential to employ target organs for the cultivation of rabies viruses and while these agents have been cultivated with notable success in hetero-specific cell strains (SANDERS, KIEM and LANGUNOFF 1953; KISSLING 1958; ATANASIU and LÉPINE 1959), the opportunity to study the behavior of this virus in elements derived from nervous tissue should not be overlooked. Attention directed at the elucidation of the cytopathology of virus within nerve cells and neuroglial elements might prove rewarding.

Nervous tissue has not yielded differentiated cell strains but recent notable successes have been achieved in the maintenance of various cell types for periods adequate for investigations on viral infectivity. The cerebellum of newborn kittens and puppies has proven particularly manageable *in vitro* (POMERAT and COSTERO 1956). The mesencephalic root of the fifth nerve (HILD 1957), the paraventricular nucleus (BORGHESE 1954; HILD 1957), the reticular formation (OKAMOTO 1958), the corpus callosum (LUMSDEN and POMERAT 1951) and dorsal root ganglia of chick embryos (PETERSON and MURRAY 1955; NAKAI 1956) offer valuable test objects.

The purpose of the present study was to demonstrate cytopathological effects of fixed rabies virus in cells cultivated from Ammon's horn and cerebellum of the puppy and the kitten.

### Materials and methods<sup>1</sup>

*Tissue culture.* Cerebellar and Ammon's horn tissue was obtained from kittens and puppies in the first week of life by decapitation and rapid exposure of the brain. Ammon's horns were dissected out according to the technique described by TIERKEL (1955). Ammon's horn and cerebellar folia were cut into cubical fragments approximately 1 to 2 mm side length and washed in GEX's balanced salt solution (BSS). These fragments were explanted on 12 × 50 mm cover slips of 1 thickness in a clot consisting of equal parts of heparinized cockerel plasma and embryonic extract obtained from 9-day chick embryos. Generally, three explants were mounted per cover slip. After the clot had become firm two cover slips were inserted back-to-back into each roller tube. Two hours after explantation 2 ml of nutrient fluid medium was added. The nutrient fluid consisted of 50% GEX's BBS, 45% human ascitic fluid and 5% embryonic extract. The glucose content of the medium was increased

\* This research was supported in part by a grant from the Fundação Calouste Gulbenkian and in part by Office of Naval Research Contract No. Nonr-1598(01).

<sup>1</sup> Grateful acknowledgment is due to Dr. M. ALBERTINA FERNANDES for help in the management and maintenance of the cultures. Special thanks are due to Messrs. C. G. LEFFER and E. E. PITSINGER for the preparation of the photographs and to Mr. R. O. PERRY for collecting and assembling the data.

from 100 to 300 mg-%. Penicillin, 100 units per ml and neomycin, 100  $\gamma$  per ml, were added to the fluid nutrient to insure against chance contamination. The cultures were incubated at 37° C in a drum turning 8 times per hour.

Microscopic observations and microphotographs of control and inoculated living cells were made with phase contrast optics as well as after fixation and staining.

*Virus.* Two strains of fixed rabies viruses were used. One was adapted to mice (MS) and the other to rabbits (RS). The viruses were stored lyophilized at -70° C.

*Neutralization.* The serum utilized was obtained from a hyperimmunized horse. Serum neutralization tests were performed by inoculating tubes with 0.2 ml of serum-virus mixture. A constant amount of virus was mixed with serial two fold dilutions of immune serum and the mixture maintained at room temperature for one hour. The serum neutralization effect was recorded when approximately 100 LD<sub>50</sub>/ml of virus was seen to produce a complete destruction of neurons and a clear degeneration of neuroglial elements in the virus control that was carried out simultaneously.

## Results

Cultures of cerebellum and Ammon's horn were inoculated when the explants had flattened to such a degree that transillumination for microscope observation was possible and when a good outgrowth was present. Generally this was between the 20th and 40th day following explantation. The outgrowth from cerebellar explants derived from kittens and puppies has been reported by POMERAT and COSTERO (1956) and, therefore, a description of its general appearance is not essential. A detailed analysis of results obtained from the cultivation of Ammon's horn is in preparation. Generally, neurons of this zone are rather smaller than those obtained from cerebellar explants.

For inoculation, 100 LD<sub>50</sub>/ml (mouse) of both strains of fixed rabies virus were used. Cultures were then inspected from time to time and cover slips were removed from the roller tubes, mounted in closed or perfusion chambers and observed with phase contrast optics.

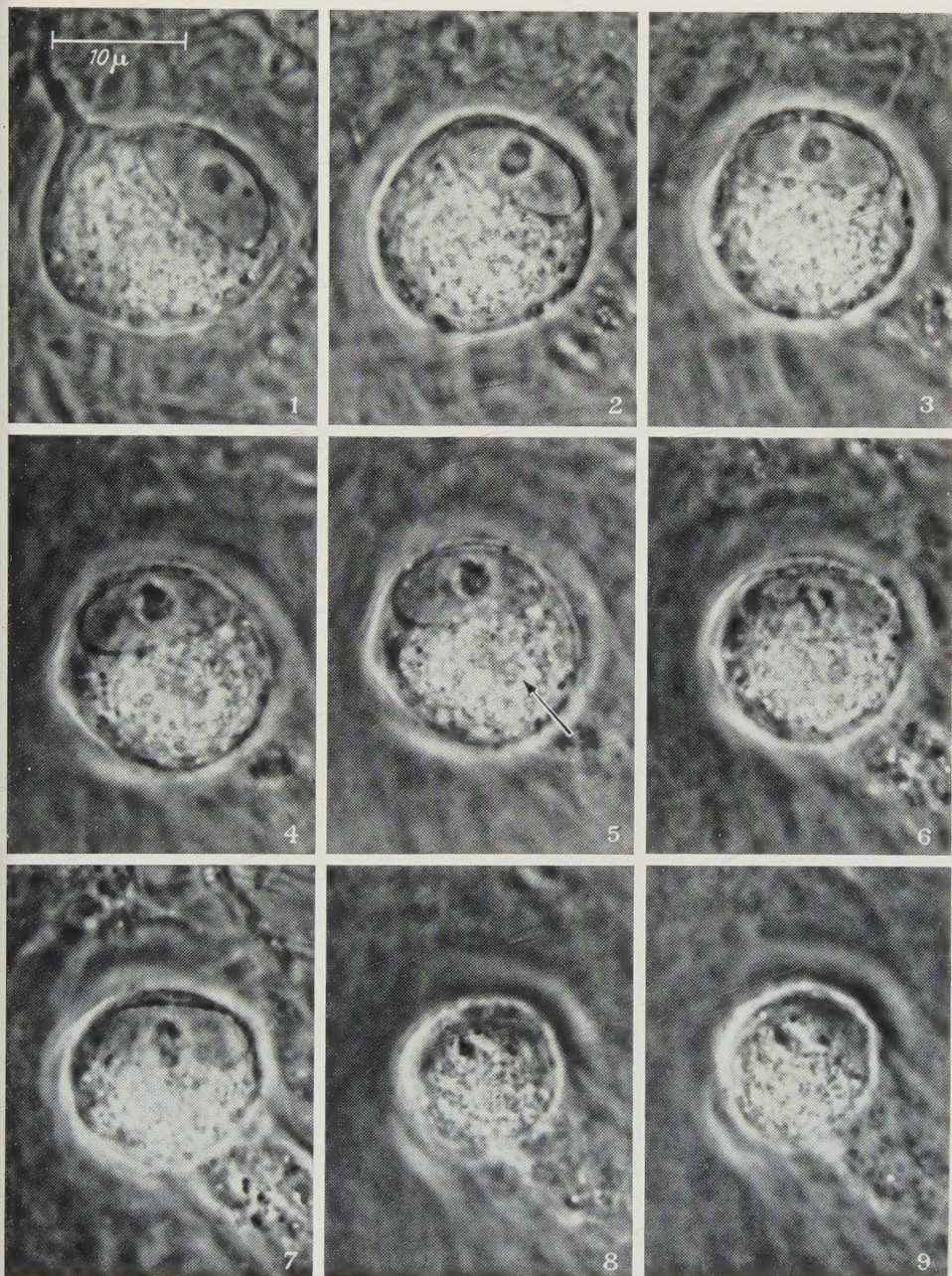
The cytopathogenic effect produced by the virus was first observed on neurons. Between the 24th and the 35th hour following inoculation these elements began to shrink. During the same period an inclusion-like mass could be observed in the cytoplasm of almost all neurons of inoculated cultures. After 48 hours this inclusion-like body was clearly discernible. The shrinkage was more accentuated 60 hours later, and all nerve cells were completely destroyed at approximately the 78th hour following inoculation. In the control cultures no degeneration or inclusion-like bodies could be detected.

Since it is possible to find intracytoplasmic inclusion-like bodies in non-inoculated cells from nerve tissues (BARSKI and MAURIN 1950), experiments were conducted in perfusion chambers in order to exclude this phenomenon. Neurons in cover slip preparations were located with the use of phase contrast microscopy and photographed before and after nutrient fluid containing 100 LD<sub>50</sub>/ml of virus was perfused. Photographs were made at suitable intervals to follow the formation of inclusion bodies. Fig. 1 to 9 illustrate phenomena observed in such experiments.

After fixation with BOUIN's and staining by hematoxilin-eosin or by the SELLERS method (1955), inclusion bodies also could be detected as shown in Fig. 10.

Glial cells are more resistant to the cytopathogenic effect of the fixed rabies virus. Only after 8 days following inoculation were some differences evident in





Figs. 1—9. Fig. 1 represents a neuron from the Ammon's horn of a newborn kitten before inoculation of the virus. Figs. 2—9 illustrate the cytopathogenic effect of 100 LD<sub>50</sub>/ml on mice of the fixed rabies virus (MS) on the same neuron at frequent intervals, until complete destruction of the cell. In Figs. 4—6 an inclusion body can be seen. Fig. 2. 1 hours 9 min following inoculation. Fig. 3. 3 hours 7 min following inoculation. Fig. 4. 7 hours 37 min following inoculation. Fig. 5. 7 hours 41 min following inoculation. Fig. 6. 13 hours 15 min following inoculation. Fig. 7. 14 hours 20 min following inoculation. Fig. 8. 7 hours 45 min following inoculation. Fig. 9. 23 hours following inoculation. Phase contrast photomicrographs. The scale of magnification for all figures is the same as that shown in upper left area of Fig. 1



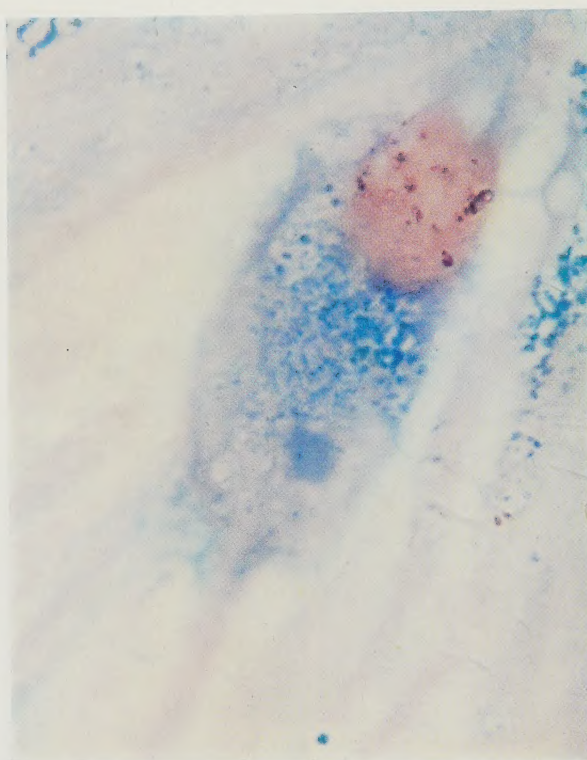


Fig. 10. Inclusion body in a nerve cell after staining by the SELLERS method. Magnification 1000  $\times$

relation to control cultures. At that time a slight shrinkage of glial elements could be observed as well as an increased granularity, which are illustrated in Figs. 12 and 14.

During the first three passages of the virus *in vitro*, no cytopathogenic effect could be detected on mesenchymal cells nor on the fibroblast-like elements. However, as the number of these passages was increased, these cells appeared to become more susceptible. This phenomenon, in relation to the virus titers obtained, is under further investigation.

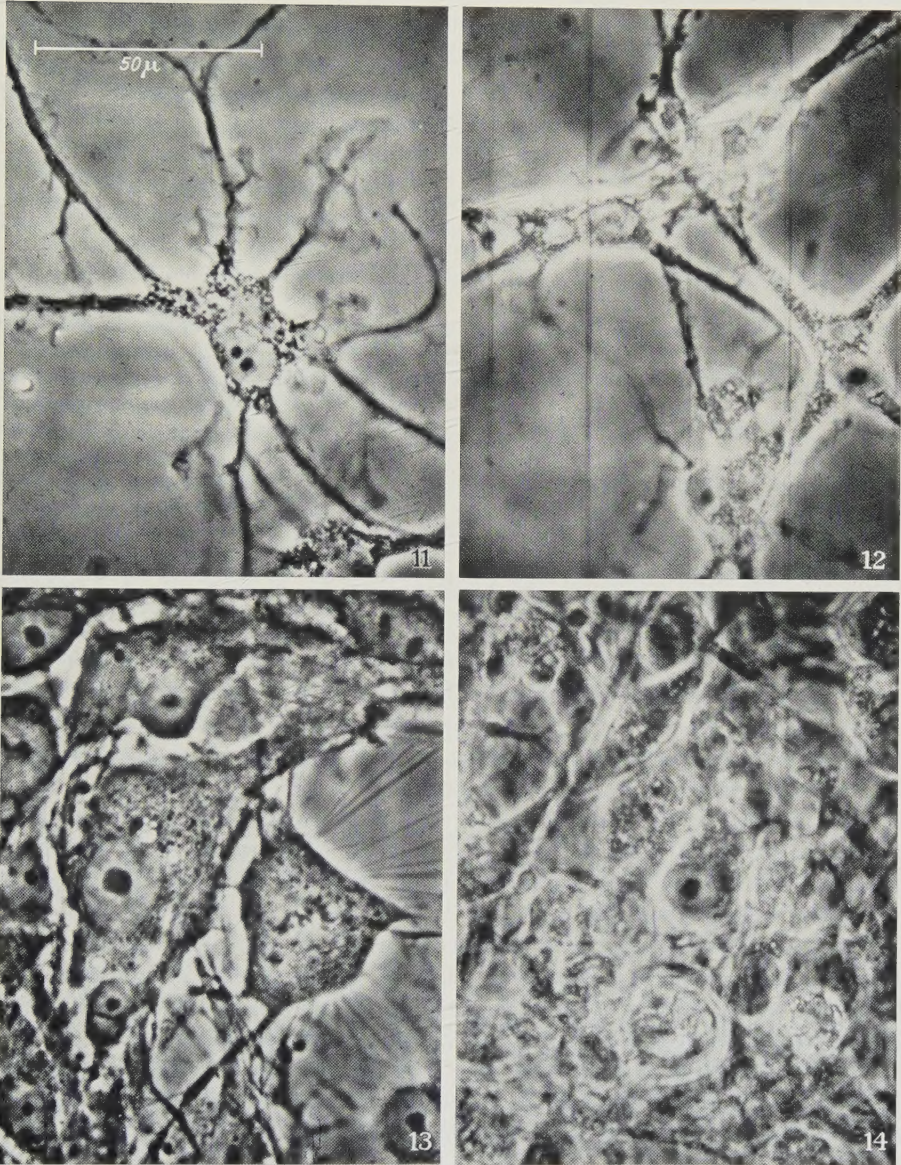
Titration of propagated virus in nervous tissue *in vitro* have been done on mice. The APR. 100 LD<sub>50</sub> endpoint was calculated by the method of REED and

MUENCH (1938). Results are summarized in Fig. 15. These titrations showed that fixed rabies virus (MS) multiplies in nervous tissue *in vitro*, although titers were much lower than those obtained from the mouse-passed virus. Similar

Table. Serum-virus neutralization *in vitro*

Serum dilution	Virus	Days after inoculation					
		1	2	3	4	5	6
Undiluted	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:2	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:4	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:8	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:16	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:32	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:64	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	0	0	0	0	0
1:128	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	0	—+	+	++	+++	++++
Controls							
Normal serum	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	—+	+	++	++++	++++	++++
No serum	APR. 100 LD <sub>50</sub> /ml	—+	+	++	++++	++++	++++





Figs. 11—14. Figs. 12 and 14 show glial cells 8 days following inoculation with fixed rabies virus (RS). Notice shrinkage and increased granulation. Figs. 11 and 13 show control cultures of similar elements. Phase contrast microphotographs. The scale of magnification for all figures is the same as that shown in the upper left area of Fig. 11

results were obtained with the RS virus using both cerebellar and Ammon's horn cultures.

*Neutralization tests.* Using the virus suspension diluted to contain approximately APR. 100 LD<sub>50</sub>/ml a neutralization endpoint of 1:64 was found for the immune serum with which these studies were performed. Neutralization tests



were conducted for the virus of every passage *in vitro* (MS and RS strains), with very similar results. An example of one of these is shown in the table.

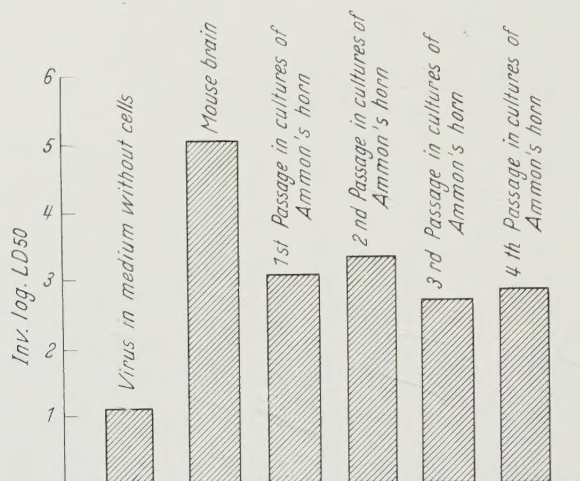


Fig. 15. Titrations of fixed rabies virus (MS) propagated *in vitro* and in mice. The LD<sub>50</sub> endpoint was calculated on mice by the method of REED and MUENCH

### Discussion and conclusions

The data presented gives evidence that fixed rabies virus multiplies in cultures of nervous tissue *in vitro*. The cytopathogenic effect caused by the virus was first observed on neurons, in which cells an inclusion-like body resembling the Negri type was found in the cytoplasm.

Titers for the virus passed in cultures of nervous tissue *in vitro* were lower than those obtained from the virus passed in mice or rabbits. At the fourth passage of the virus *in vitro* the titer was approximately  $10^{-3}$ , which gives ample evidence of viral multiplication.

The titer probably depended primarily on the invasion of glial cells which are much more numerous than neurons, as ATANASIU (1959) demonstrated for the street virus. However, cytopathological effects observed earlier in nerve cells suggested the predilection of the virus for these elements.

As the number of virus passages *in vitro* increased, cellular degeneration of glial and mesenchymal elements began to be more evident, although no changes in incubation period or virus titers could be detected.

These experiments showed that fixed rabies virus induces the formation of intracytoplasmic oxyphilic inclusion-like masses resembling Negri bodies. Time lapse phase contrast cinematography was also used in the study of the nerve cell-virus system. With this technique the formation of the inclusion-like body could be followed until the complete destruction of the neurons.

### References

- ATANASIU, P., and P. LÉPINE: Multiplication du virus rabique des rues sur la tumeur ependymaire de la souris en culture de tissus. Effet cytolytique. Ann. Inst. Pasteur **96**, 72-78 (1959).



- BARSKI, G., and J. MAURIN: Inclusions négroformes en culture de tissu nerveux en l'absence du virus rabique. *Ann. Inst. Pasteur* **78**, 411 (1950).
- BORGHESE, E.: Mammalian hypothalamic nuclei cultivated *in vitro*. *Tex. Rep. Biol. Med.* **12**, 215—228 (1954).
- HILD, W.: Ependymal cells in tissue culture. *Z. Zellforsch.* **46**, 259—271 (1957).
- Observations on neurons and neuroglia from the area of the mesencephalic fifth nucleus of the cat *in vitro*. *Z. Zellforsch.* **47**, 127—146 (1957).
- KISSLING, R. E.: Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **98**, 223—225 (1958).
- LUMSDEN, C. E., and C. M. POMERAT: Normal oligodendrocytes in tissue culture. *Exp. Cell Res.* **2**, 103—114 (1951).
- NAKAI, J.: Dissociated dorsal root ganglia in tissue culture. *Amer. J. Anat.* **99**, 81—129 (1956).
- OKAMOTO, M.: Observations on neurons and neuroglia from the area of the reticular formation grown *in vitro*. *Z. Zellforsch.* **47**, 269—287 (1958).
- PETERSON, E., and M. R. MURRAY: Myelin sheath formation in cultures of avian spinal ganglia. *Amer. J. Anat.* **96**, 319—356 (1955).
- POMERAT, C. M., and I. COSTERO: Tissue cultures of cat cerebellum. *Amer. J. Anat.* **99**, 211—247 (1956).
- REED, L. J., and H. MUENCH: Simple method of estimating 50 per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.* **27**, 495—497 (1938).
- SANDERS, M., I. KIEM and D. LANGUNOFF: Cultivation of viruses: A critical review. *A.M.A. Arch. Path.* **56**, 148—225 (1953).
- SELLERS, T. F.: Reference in: LA RAGE, *Technique de laboratoire, organisation mondial de la santé, livre de monographies*, Nr 33, p. 32, 1955.
- TIERKEL, E. S.: *Recherche extemporanée des corps de negri par impression sur les lames. Préparation des specimens pour les essais biologiques. La rage, techniques des laboratoire, organisation mondial de la santé, livre de monographies*, Nr 33, p. 24—39, 1955.

Prof. C. M. POMERAT,

Pasadena Foundation for Medical Research, 99 North El Molino Avenue, Pasadena,  
California

Dr. MÁRIO VASCO FERNANDES,

Laboratorio Nacional de Investigação Veterinária, Lisbon I (Portugal)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Yonago, Japan (Direktor: Prof. Dr. M. Iro)

## ZUR POLARISATIONSOPTISCHEN ANALYSE DER KNOCHENLAMELLENSYSTEME DES MENSCHEN

Von

KÉIICHI TANAKA

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Oktober 1960)

### Einleitung

Obwohl sich die Knochengrundsubstanz im allgemeinen aus kollagenen Fibrillen und Hydroxylapatitkristallen zusammensetzt, weist ein spezifischer Teil davon bekanntlich chemische und physikalische Besonderheiten auf. W. J. SCHMIDT (1932/33) zeigte, daß manche ausgekochten Schriffe bei konstant gehaltener Brechzahl der Durchtränkungsflüssigkeit im Gebiet der Umkehr des optischen Charakters keineswegs eine einheitliche Polarisationsfarbe darbieten, sondern daß einzelne Haverssche Lamellen oder Gruppen von solchen nebeneinander in ganz verschiedenen anomalen Farben erscheinen: wenn der möglichst dünne Schliff mit konzentrierter Thouletscher Lösung imbibiert wird, bot sich eine Anzahl innerster Lamellen eines Haversschen Systems gelb, eine Zone folgender Lamelle blau, darauf eine weitere Lamelle rot, schließlich eine letzte Lamelle wiederum blau dar. Nach W. J. SCHMIDT ist dieses Phänomen auf verschiedenem Grad der Verkalkung zu beziehen. Der Verfasser (TANAKA 1958) stellte in einer histologischen und polarisationsoptischen Analyse uralter Menschenknochen sicher, daß die innerste Lamelle der Haversschen Systeme, ferner äußere und innere Grundlamellen dem Verwitterungsprozeß nach der Bestattung bedeutend stärker widerstehen als andere Lamellensysteme. Im folgenden hat er die Unterschiede im Bau der innersten Haversschen Lamelle und der anderen weiterhin untersucht<sup>1</sup>.

### Material und Methodik

Zur Untersuchung der *anorganischen* Substanz des Knochens wurden sog. mineralisierte Quer- und Längsschliffe des Femur in Glycerinkalilauge ausgekocht und Imbibitionsmedien mit Brechungsindices von 1,36 bis 1,74 verwendet. Zur Messung des Gangunterschiedes diente der Berek-Kompensator der Leitz-Werke. Die Prüfung der *organischen* Substanz erfolgte an Gefrierschnitten des entkalkten frischen oder mazerierten Knochens; als Entkalkungsflüssigkeit diente die Lösung des Trisodiumäthylendiamintetraacetats, 5% HNO<sub>3</sub> u.a.

### Befunde

a) *Anorganische Substanz*. Es ist bekannt, daß die sog. streifigen Lamellen *mineralisierter* Knochenschliffe unter genügender Variation der Brechzahl des imbibierenden Mediums den optischen Charakter zweimal umkehren, d. h. nacheinander positiv, negativ und dann wieder positiv zu der Verlaufsrichtung der Fibrillenröhrchen werden. Hier wurde der Unterschied der Doppelbrechung zwischen der *innersten Lamelle* und einer „*Vergleichslamelle*“ eines Haversschen

<sup>1</sup> Es ist dem Verfasser eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. W. J. SCHMIDT (Gießen) für nützliche Ratschläge auch an dieser Stelle aufrichtigen Dank zu sagen.



Systems untersucht; als letztere wurde jene gewählt, die bei der Brechzahl 1,59 des Imbibitionsmittels die stärkste negative Doppelbrechung unter den benachbarten Lamellen zeigte. Die Meßergebnisse sind in der Tabelle und in Abb. 1 dargestellt; die Doppelbrechungswerte der innersten Haversschen Lamelle liegen längs der Kurve *B*, die der Vergleichslamelle entlang der Kurve *A* der Abb. 1. Am Längsschliff dagegen bietet die innerste Lamelle kaum Doppelbrechung dar, woraus sich schließen läßt, daß ihre Fibrillenröhrchen miteinander parallel den Haversschen Kanal zirkulär umgürten, so daß die Verlaufsrichtung der Röhrchen senk-

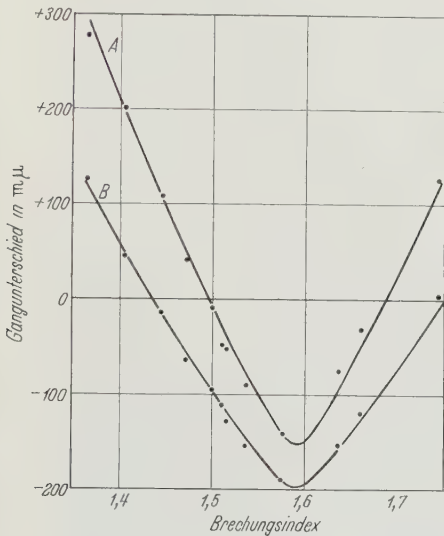


Abb. 1. Gesamtdoppelbrechungskurve der innersten Haversschen Lamelle (*B*) und der Vergleichslamelle (*A*)

Tabelle. Gangunterschied und Vorzeichen der zwei geprüften Lamellen bei Imbibition des ausgekochten Femur-Querschliffes  
(Dicke des Präparates 90  $\mu$ )

Brechungs- index des Imbibitions- mittels	Gangunterschied in $m\mu$ , Vorzeichen der Doppelbrechung	
	Innerste Havers- Lamellen	Vergleichs- Havers- Lamellen
1,365	127	278
1,405	46,4	201
1,445	13,9 (—)	109
1,472	65,8 (—)	40,1
1,500	95 (—)	8,8 (—)
1,510	112 (—)	48,6 (—)
1,515	129 (—)	53,3 (—)
1,536	158 (—)	91 (—)
1,575	190 (—)	142 (—)
1,635	155 (—)	76 (—)
1,658	120 (—)	31,3 (—)
1,74	4,4	127

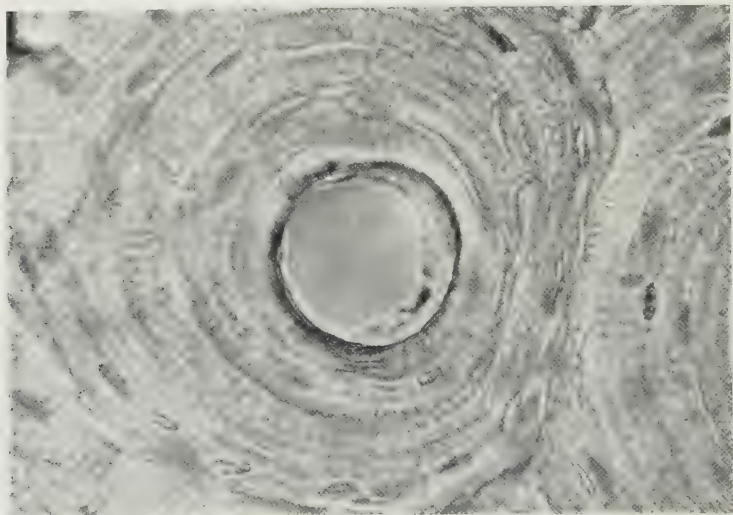
recht zur Kanalachse liegt und weiter die Hydroxylapatitkristallite mit ihren optischen Achsen parallel zum Röhrchenverlauf orientiert sind.

In bezug auf die Orientierungsrichtung der Fibrillenröhrchen und Hydroxylapatitkristallite verhält sich also die innerste Lamelle verschieden von der Grenzscheide der Lakunen, weil deren Fasern und Hydroxylapatitkristallite nach allen Richtungen tangential zur Oberfläche liegen (W. J. SCHMIDT 1959).

Nach ASCENZI (1950) ist die Doppelbrechungskurve bei Imbibition der anorganischen Grundmasse des Knochengewebes mit einer abgestuften Flüssigkeitsreihe parabolisch. Theoretisch aber sollen sich die Werte der Formdoppelbrechung des Stäbchen-Mischkörpers bei Imbibition mit einer Reihe von Flüssigkeiten, deren Brechzahl stufenweise ansteigt, zu einer hyperbolischen Kurve aneinanderreihen. Die Kurven des Verfassers sind auch Hyperbeln. Andererseits bestehen wesentliche Unterschiede zwischen *A*- und *B*-Kurven, obwohl beide Hyperbeln sind:

1. Bei der Brechzahl 1,59 des Imbibitionsmittels liegt der Fußpunkt der *A*-Kurve bei einem Gangunterschied von 160  $m\mu$ , derjenige der *B*-Kurve bei 200  $m\mu$  im negativen Gebiet; d. h. die innerste Lamelle besitzt stärkere negative Doppelbrechung als die Vergleichslamelle.

2. Die Umkehrpunkte des optischen Charakters der beiden Lamellen sind voneinander verschieden; sie liegen für die *A*-Kurve bei  $n = 1,5$  und  $1,68$ , für die *B*-Kurve bei  $n = 1,44$  und  $1,74$ .



a



b

Abb. 2 a u. b. Mineralisierter Femurquerschliff in Benzol ( $n = 1,5$ ), im gewöhnlichen Licht (a) und zwischen Pol. + (b), 400:1; nur die innerste Havers-Lamelle zeigt Doppelbrechung, die übrigen verhalten sich neutral

3. Der Aufstieg der *A*-Kurve ist steiler als jener der *B*-Kurve.

Aus diesen Unterschieden der beiden Kurven möchte der Verfasser schließen, daß die innerste Lamelle mehr Hydroxylapatitkristallite als die Vergleichslamelle enthält (Näheres s. S. 442).

*b) Organische Substanz.* 1. Nach Gerbung mit Tannin-Lösung ist das optische Vorzeichen von Schnitten entkalkten Knochens mit gewöhnlicher Kollagen-



substanz zwischen den Brechzahlen 1,36 und 1,65 des Imbibitionsmittels negativ, nicht aber bei der innersten Lamelle.

2. Negative Doppelbrechung der innersten Lamelle äußert sich nur dann, wenn der Schnitt ausgetrocknet oder mit Alkohol entwässert und dann in nicht-wäßrigen Medien eingeschlossen ist. Wird der mit Tannin gegerbte und getrocknete Knochenschnitt z. B. in Isosafrol eingebettet, so ist die negative Doppelbrechung der innersten Lamelle gegenüber den positiven übrigen Haversschen Lamellen besonders beträchtlich (Abb. 3).

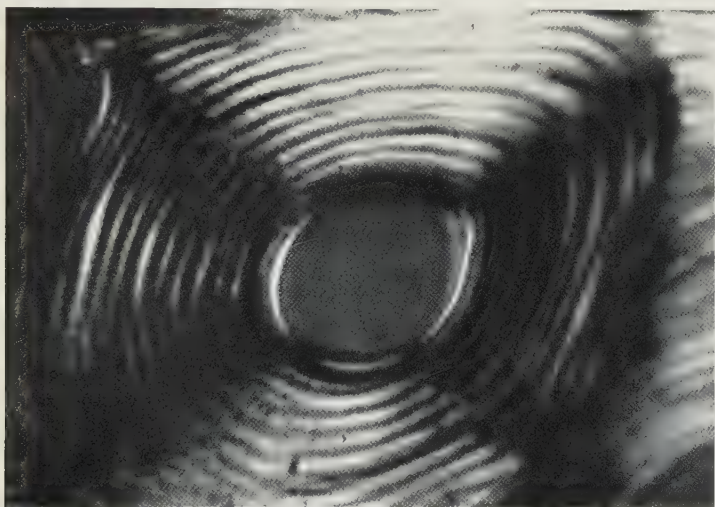


Abb. 3. Mit Tannin gegerbter, dann getrockneter Schnitt entkalkten Knochens in Isosafrol  $n = 1,57$ . Pol.  $\times$ , Glimmerkompensator, 400:1: innerste Lamelle negativ, die übrigen positiv doppelbrechend

3. Behandlung der Schnitte mit 10%iger Lösung von KOH, KCl,  $\text{CaCl}_2$ ; Kalk-Wasser, HCl-Pepsin (37°, 12 Std) hat auf die Doppelbrechung der innersten Lamelle keinen Einfluß.

4. Behandlung mit Trypsin-Lösung (1%, pH 8, 37°, 24 Std) löscht die Doppelbrechung der innersten Lamelle leicht aus.

Nach dem Vorstehenden liegt die Vermutung nahe, daß eine von Kollagen abweichende Substanz in dem Bau der innersten Haversschen Lamelle eine Rolle spielt.

### Kritische Besprechung

Aus den erwähnten Befunden ergibt sich, daß in der *anorganischen Substanz* der innersten Lamelle des Haversschen Systems wie in jener der Vergleichslamelle parallel verlaufende Fibrillenröhrchen vorhanden sind, die den Haversschen Kanal zirkulär umgeben; entsprechend verlaufen die optischen Achsen der Hydroxylapatitkristallite.

Es ergaben sich aber an Hand der Imbibitionsdaten drei Unterschiede zwischen A- und B-Kurven (Abb. 1). Diese Unterschiede könnten durch das relative Volumen von Fibrillenröhrchen, durch Hydroxylapatitkristallite und Lücken in der Kristallitmasse (Intermicellarräume), in den Lamellen verursacht sein. Die

Doppelbrechung des idealen Stäbchen-Mischkörpers gehorcht bekanntlich der Wiener'schen Formel:

$$n_e^2 - n_o^2 = \frac{\delta_1 \delta_2 (n_1^2 - n_2^2)^2}{(\delta_1 + 1) n_2^2 + \delta_2 n_1^2}.$$

Es bedeuten:  $n_e$  = die außerordentliche Brechzahl (Schwingungsrichtung parallel zur Achse des Mischkörpers),  $n_o$  = die ordentliche Brechzahl (senkrecht zur Achse),  $n_1$  = die Brechzahl der Stäbchen,  $n_2$  = die Brechzahl der Zwischenmasse,  $\delta_1$  = das Volumen der Stäbchen,  $\delta_2$  = das Volumen der Zwischenmasse.

Diese Formel besagt, daß die Stärke der Formdoppelbrechung von der Brechzahl und dem relativen Volumen der Komponenten abhängt und daß sie — ceteris paribus — ein Maximum erreicht, wenn die Volumina der Komponenten gleich sind. Nach W. J. SCHMIDT (1932/33) setzt sich die Formdoppelbrechung des ausgekochten Schlißes aus zweierlei Stäbchen-Mischkörpern zusammen: erstens aus Fibrillenröhrchen mit Imbibitionsmedium gefüllt (als Stäbchen) und Mineralgerüst (als Zwischenmasse), zweitens aus Hydroxylapatitkristalliten (als Stäbchen) und Intermicellarräume mit Imbibitionsmedium gefüllt (als Zwischenmasse). Ist das relative Volumen von Fibrillenröhrchen und Mineralgerüst in der innersten Lamelle jenem in der Vergleichslamelle gleich, so hängt der Unterschied der *A*- und *B*-Kurve vom verschiedenen Volumen der Intermicellarräume und Hydroxylapatitkristallite in den beiden Lamellen ab und umgekehrt. W. J. SCHMIDT (1932/33) zeigte, daß die Größen der Intermicellarräume zwischen der innersten Lamelle und äußeren Lamellen im Haversschen System verschieden sind.

Wenn nun in der innersten Lamelle das Volumen der Hydroxylapatitkristallite das der Intermicellarräume übersteigt und wenn der Volumenunterschied größer ist als in der Vergleichslamelle, so muß sich die Formdoppelbrechungskurve der ersteren mehr als die der zweiten abflachen, und die Fußpunkte der ersteren Kurve müssen gemäß der Stärke der negativen Eigendoppelbrechung des Hydroxylapatites niedriger als die der zweiten Kurve liegen (unter Erhaltung des Abszissenwertes). Das gleiche gilt für den Fall, daß die innerste Lamelle mehr Mineralgerüst und weniger Fibrillenröhrchen als die Vergleichslamelle enthält. Außerdem wird der Unterschied der organischen Substanz zwischen den beiden Lamellen beobachtet (s. S. 440). Man kann daher der Annahme zuneigen, daß nicht nur der Unterschied von Intermicellarräumen und Hydroxylapatitkristalliten, sondern auch von Fibrillenröhrchen und Mineralgerüst an der Differenz der *A*- und *B*-Kurven beteiligt ist. In jeder Beziehung enthält die innerste Lamelle mehr Hydroxylapatitkristallite als Vergleichslamelle. Weiter läßt sich der Volumenunterschied des Hydroxylapatits zwischen beiden Lamellen nach dem Vergleich des Fußpunktes der beiden Kurven berechnen, d. h.  $B_{ca} : A_{ca} = 200 : 160 = 5 : 4$ .

Wir wissen, daß die *organische Substanz* des Knochens im allgemeinen als Kollagen, Osseomucoid und Ossealbumoid u. a. ausgebildet ist. Unsere Ergebnisse besagen, daß der organische Anteil der innersten Lamelle von der gewöhnlichen Kollagensubstanz des Knochens etwas verschieden ist, und daß die Doppelbrechung dieser Lamelle nicht von Osseomucoid abhängt, weil dieses durch Kalkwasser,  $\text{CaCl}_2$ - und  $\text{KCl}$ -Lösung extrahiert wird. Obwohl sich diese Substanz noch nicht bestimmen läßt, so steht doch fest, daß ein von Kollagen abweichendes Material im Bau der innersten Lamelle eine Rolle spielt.



Es gelang also, polarisationsoptisch Unterschiede zwischen der innersten Havers-Lamelle und den sonstigen Lamellen nachzuweisen, womit auch die starke Resistenz der innersten Havers-Lamelle gegen den Verwitterungsprozeß unter der Erde zusammenhängen dürfte.

### Zusammenfassung

Die physikalischen und chemischen Unterschiede zwischen der innersten Havers-Lamelle und den sonstigen Lamellen wurden an menschlichen Knochen polarisationsoptisch untersucht. Es ergab sich, daß die innerste Lamelle mehr Hydroxylapatitkristallite als die übrigen Lamellen enthält, und die organische Substanz der ersten aus einer von Kollagen abweichenden Substanz besteht.

### Literatur

- ASCENZI, A.: On the existence of bonds between ossein and inorganic bone fraction. *Science* **112**, 84—86 (1950).
- SCHMIDT, W. J.: Der Feinbau der anorganischen Grundmasse des Knochengewebes. *Ber. Oberhess. Ges. Naturwiss. Heilk.* **15**, 219—247 (1932/33).
- Grenzscheiden der Lakunen und Kittlinien des Knochengewebes. Polarisationsoptische Analyse kollagenfreier kongorotgefärbter Schliffe. *Z. Zellforsch.* **50**, 275—296 (1959).
- TANAKA, K.: Polarisationsoptische Analyse der Knochenlamellensysteme des Menschen. *Yonago Acta med.* **3**, 69—95 (1958).

Prof. Dr. K. TANAKA,  
Anatomisches Institut der Tottori Universität Yonago, Japan

Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Tübingen

## DAS LAMELLARE DÜNN-DICK-MUSTER DER CHLOROPLASTEN VON *CHLAMYDOMONAS*, *EUGLENA*, *FUCUS*, *VAUCHERIA*

Von

EMIL HEITZ\*

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Oktober 1960)

In einer kürzlich erschienenen Mitteilung (HEITZ 1960) wurde vermutet, daß „der Wechsel von dünnen und dicken Lamellen und deren Zusammensetzung zu Lamellenpaketen, bei Chloroplasten, welche nur die Grundstruktur besitzen, viel häufiger, wenn nicht sogar immer vorkommt“. Als Belege wurden angeführt: Die Lamellierung des Chloroplasten einer Dinoflagellate, *Amphidinium elegans*, nach GRELL und WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957), eines Lebermooses, *Anthoceros crispulus* und der Volvocale *Chlamydomonas eugametos*, HEITZ (1960). Das bei den 2 letztgenannten Pflanzen gefundene „lamellare Dünn-Dick-Muster“, wie es von jetzt ab genannt sei, stand im Gegensatz zu den Bildern bzw. Angaben früherer Verfasser (CHARDARD, KAJA, SAGER und PALADE, Lit. bei HEITZ 1960). In der vorliegenden Studie wurden außer *Chlamydomonas* 3 weitere Algen von ganz verschiedener systematischer Stellung untersucht: *Fucus vesiculosus*, *Vaucheria* spec. und *Euglena* spec.

### Material und Methode

*Chlamydomonas* stammt aus Agar-Kulturen, die mir in dankenswerter Weise Prof. GRELL und cand. rer. nat. C. HARTMANN überließen; *Fucus vesiculosus* wurde von der Biologischen Anstalt in Helgoland bezogen; *Euglena* sammelte ich aus einer Pfütze neben einem Misthaufen; *Vaucheria* erschien auf einem Stück Erde, das mir Dr. CARR lebenswürdigerweise (zu anderen Zwecken) aus Australien geschickt hatte.

Fixierung: 1%ige  $\text{OsO}_4$ -Lösung in Veronal-Puffer von pH 7,2, 1—2 Std bei +2 bis +4° im Eisschrank. Einbettung in Methyl-Butyl-methacrylat. Nur *Euglena* wurde versuchsweise mit gutem Erfolg in Vestopal eingebettet. Herstellung der Schnitte mit dem Porter-Blum-Mikrotom, Glasmesser. Keine Kontrastierung. Untersuchung mit dem Elmiskop 1 von Siemens.

### Befunde

Zuerst sei hier ein größeres Stück des Chloroplasten von *Chlamydomonas eugametos* wiedergegeben (Abb. 1), aus dem kleinere Teile in Abb. 2 und 3 der früheren Untersuchung zu finden sind. Überall ist der Wechsel von dünnen und dicken Lamellen erkennbar und oft deren Zusammenordnung zu Lamellenpaketen. Jeweils sind 2 dünne Lamellen vorhanden, zwischen denen 1, 2, 3 oder 4 dicke Lamellen liegen. Wie in der früheren Mitteilung beschrieben, sind Stellen, die als Zusammenschluß von 2 dünnen zu einer dicken oder umgekehrt als Aufteilung von einer dicken zu 2 dünnen gedeutet werden können, durch weiße

\* Die Arbeit wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ausgeführt, der ich ebenso danke wie den technischen Assistentinnen Fräulein DÖRMER und Fräulein MÖSCHLER.



Pfeile bezeichnet (oben links mit 2, unten links mit einem Pfeil). LEFORT kam im hiesigen Laboratorium bei Untersuchung der Mutante einer anderen Alge auf Grund von verschiedenen Entwicklungsstadien zu der Überzeugung, daß es sich bei ihren Bildern um einen Zusammenschluß von 2 dünnen Lamellen handeln müsse, einer Auffassung, der ich mich damals nicht anschließen konnte. Heute neige ich eher dazu. Auf jeden Fall wäre es möglich, sich so auf einfache Weise

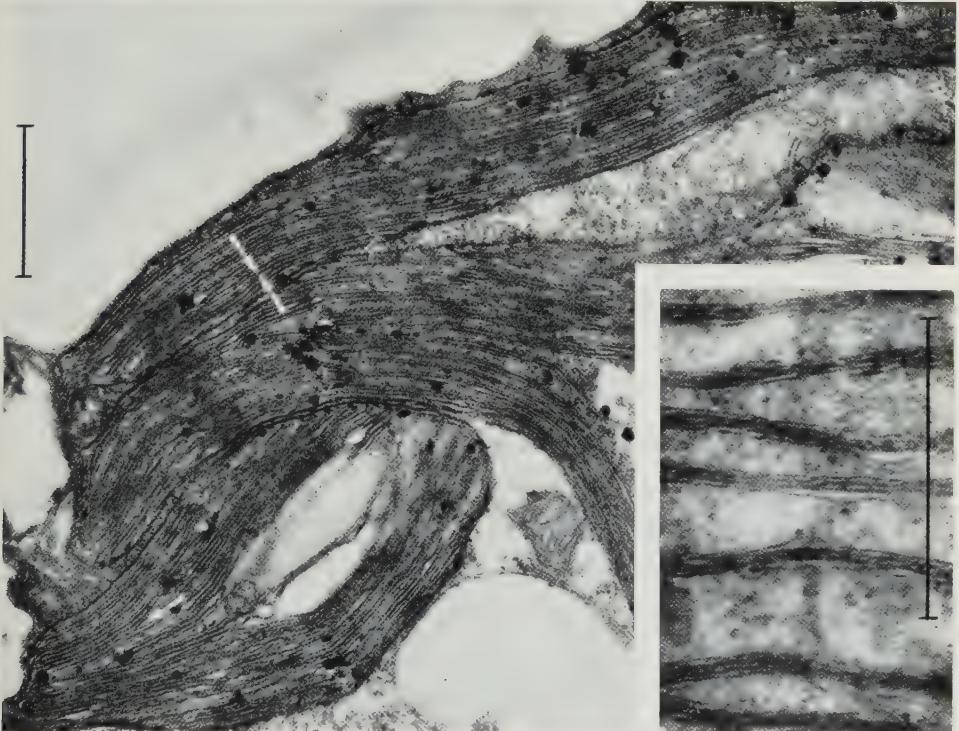


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. *Chlamydomonas eugametos*. Größeres Stück aus demselben Chloroplasten, von dem in Experimentia (Basel) 1960 nur 2 kleine Teile abgebildet sind. (Näheres vgl. Text.)  $4 \times 10000$ . Die Maßstäbe auf den Abbildungen geben alle die Länge von  $0,5 \mu$  an

Abb. 2. *Fucus vesiculosus*. Schnitt durch Konzeptakel. Alle 7 Lamellenpakete sind aus 2 dünneren äußeren und 2 dicken inneren zusammengesetzt. Vgl. Abb. 6.  $2 \times 40000$

bei höheren Pflanzen die Bildung (der wohl immer dickeren) Granalamellen durch örtlich begrenzte Vereinigung von 2 dünnen Stromalamellen vorzustellen. Auf das von HODGE u. Mitarb. bei *Zea Mais* gefundene Grana-Stroma-Muster — auf eine bestimmte Zahl von Granalamellen kommt nur die halbe Zahl von Stromalamellen — läßt sich allerdings die Vorstellung nicht anwenden, eher auf die von STEINMANN und SJÖSTRAND bei *Aspidistra* gefundenen Verhältnisse. Es sei aber ausdrücklich betont, daß es sich hierbei keineswegs um eine wohlbegründete Hypothese handeln kann, sondern lediglich um einen Gedanken, der vor allen Dingen auf Widerspruch bei denen stoßen wird, welche die Kapselnatur der Granalamellen als erwiesen ansehen.

Besonders klare Bilder ergaben die Chloroplasten von *Fucus vesiculosus* (Abb. 2, 6), *Vaucheria* spec. (Abb. 3) und *Euglena* spec. (Abb. 4, 5). Bei allen

3 Arten liegen die Lamellenpakete weiter auseinander als bei *Chlamydomonas*, und die Abstände zwischen den Lamellen innerhalb der Pakete sind ebenfalls größer. Die Zahl der dicken Lamellen scheint nur selten 2 zu übersteigen (Abb. 5,

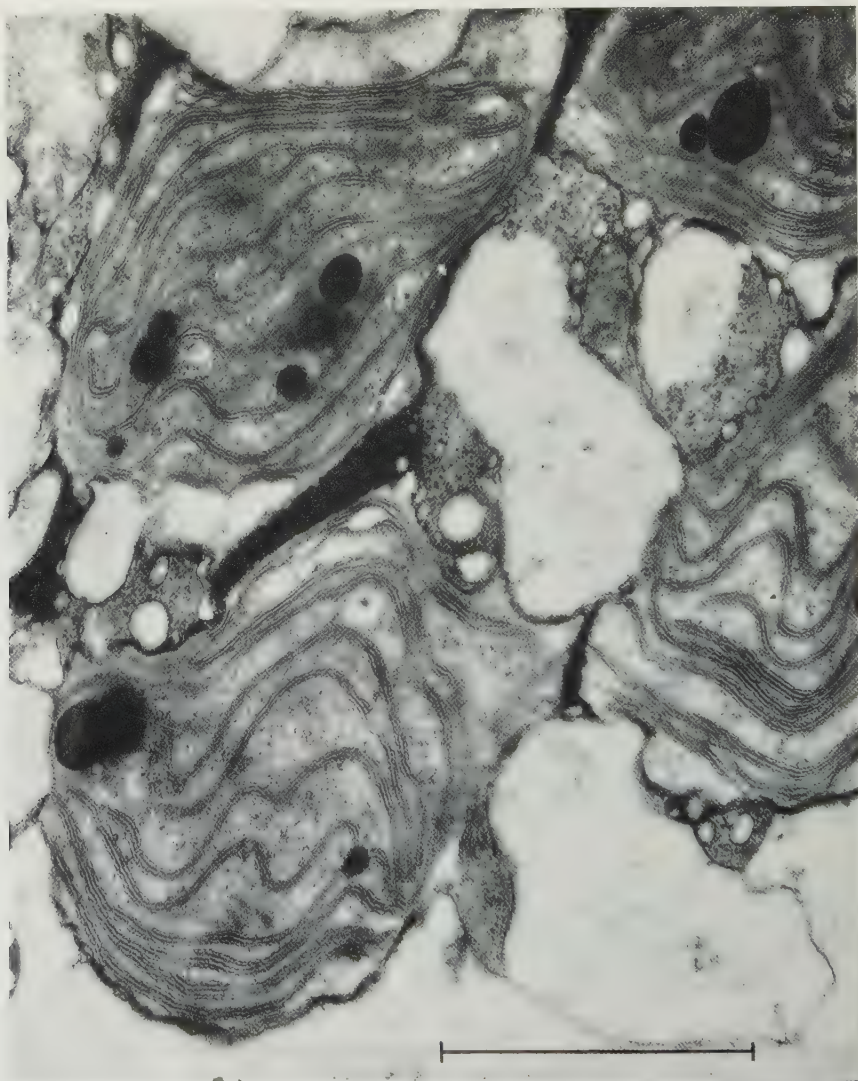


Abb. 3. *Vaucheria* spec. In den 4 Chloroplasten (bzw. Stücken von diesen) ist die Zusammensetzung der Lamellenpakete aus 2 äußeren dünnen und 2 inneren dicken besonders klar.  $2 \times 20000$

das 4. Paket von unten am linken Bildrand). Viel seltener als bei *Chlamydomonas* finden sich statt der 2 inneren dicken nur eine einzige (Abb. 4, Pfeil). Hingewiesen sei noch auf eine Besonderheit, die gelegentlich bei *Fucus vesiculosus* gefunden wurde (Abb. 6, nicht ganz im Focus?). Bei den 8 Pfeilen sind die dicken Lamellen durch je 2 dichtere Linien begrenzt. Doch müßten erst mehr Aufnahmen von dünneren Schnitten und bei besserer Auflösung vorliegen, ehe von vier dünnen Lamellen im Inneren des Paketes gesprochen werden könnte.



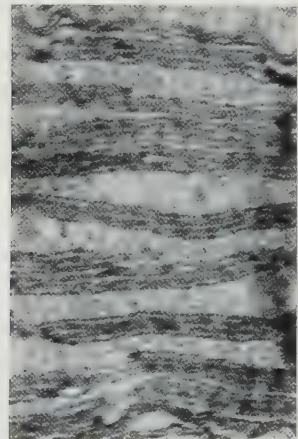
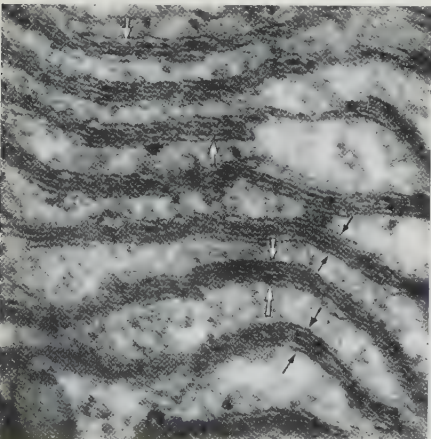
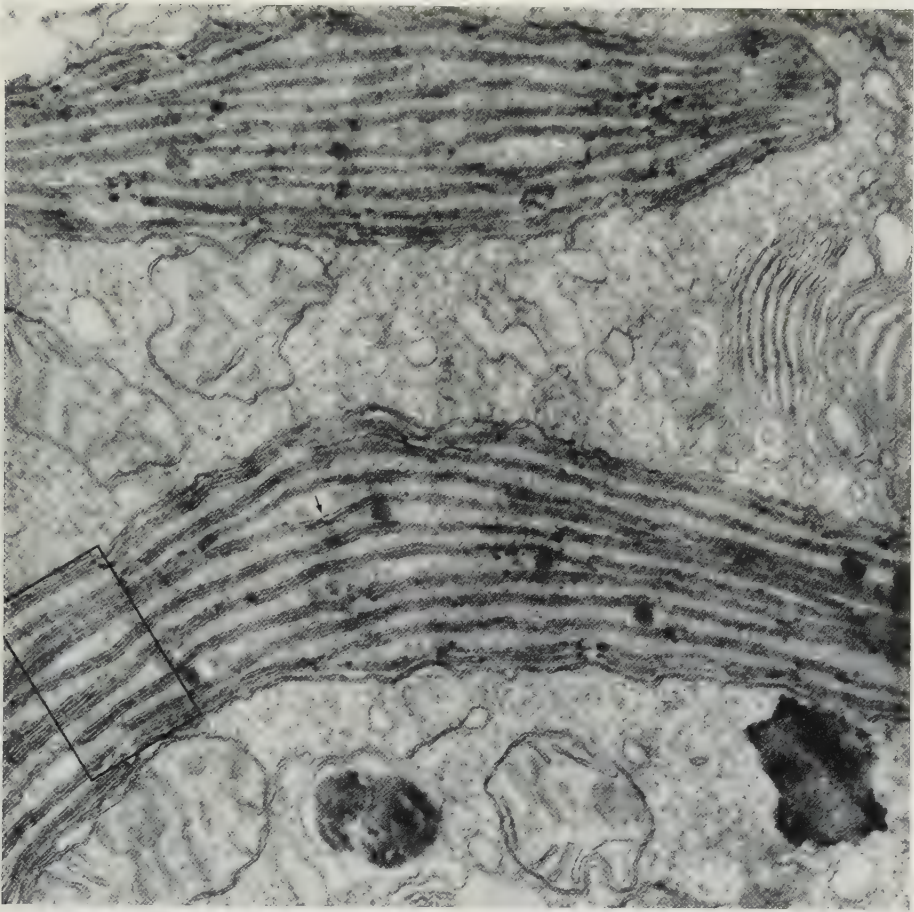


Abb. 5

Abb. 4 und 5. *Euglena spec.* Die Dünn-Dick-Struktur der Lamellenpakete ist am deutlichsten in der linken Hälfte des unten liegenden Chloroplasten; der Pfeil zeigt auf die Stelle, in welcher das Paket nur eine dicke Lamelle enthält; im Bild außer 4 Chondriosomen mit doppelter Membran und Tubuli ein Golgikörper, oben rechts.  $2 \times 20000$ . Das durch 4 Linien bezeichnete Stück im unteren Chloroplasten ist in Abb. 5 bei  $4 \times 20000$ facher Vergrößerung wiedergegeben

Abb. 6. *Fucus vesiculosus*. Schnitt durch Konzeptakel. An den 7, durch Pfeile bezeichneten Stellen, sind die zwei dickeren, inneren Lamellen durch jeweils 2 dichtere Linien begrenzt (vgl. Text),  $4 \times 20000$

Ebenso unbekannt wie dieses lamellare „Dünn-Dick-Muster“ der 5 hier genannten Algen (einschließlich *Amphidinium*) aus 5 systematisch verschiedenen Gruppen war bisher auch die Tatsache, daß bei höheren Pflanzen mit Grana-Stromamuster der Stapel der dicken Granalamellen oben und unten durch je eine dünne Lamelle begrenzt ist. Das wurde erstmals durch HEITZ sowie LEFORT (Literatur bei HEITZ 1960) bei dem Lebermoos *Aneura pinguis* sowie bei *Solanum lycopersicum* aufgefunden und von beiden Autoren im gleichen Jahre veröffentlicht. In der früheren Arbeit machte der erstgenannte darauf aufmerksam (1960), daß bei einigen Phanerogamen diese 2, das Granum begrenzenden Lamellen in den Photographien verschiedener Cytologen zwar eindeutig erscheinen, jedoch nicht als solche erwähnt werden, sei es, daß sie nicht bemerkt, sei es, daß sie nicht der Erwähnung wert gehalten wurden. Weitere Arten sind in der jüngsten Zeit hinzugekommen und beschrieben worden, ohne daß die Befunde von HEITZ sowie LEFORT aus dem Jahre 1957 Erwähnung fanden. Im ganzen sind jetzt auf Grund von einwandfreien Abbildungen bei mindestens 10 Arten aus verschiedensten Verwandtschaftskreisen diese 2 dünnen, die Grana oben und unten begrenzenden Lamellen, belegt: *Aneura*, *Selaginella*, *Picea*; *Chrysanthemum*, *Elodea*, *Eranthemum*, *Fagus*, *Nicotiana*, *Pisum*, *Solanum*.

Wenn auch weitere Untersuchungen (ebenfalls bei Algen) nötig sind, kommt man doch auf Grund der Ergebnisse an den 5 Algen und den 10 höheren Pflanzen (2 Kryptogamen, 1 Gymnosperme, 7 Phanerogamen) zu folgender Einsicht:

Neben dem Gegensatz in der Chloroplastenstruktur mit gleichmäßig dicken, durchlaufenden Lamellen bei den meisten Algen und derjenigen mit dem Grana-Stroma-Muster der höheren Pflanzen besteht demnach die Gleichheit, daß in beiden Reichen dicke Lamellen — bei höheren Pflanzen die dicken Lamellen der Granalamellen-Stapel — oben und unten durch je eine dünne Lamelle begrenzt sind.

Wie schon früher hervorgehoben (HEITZ 1960), wäre es wesentlich, wenn mit cytochemischen Methoden nach funktionellen Unterschieden zwischen dünnen und dicken Lamellen gesucht würde.

### Summary

As supposed in a previous paper, HEITZ (1960), the "lamellar thin-thick pattern" is found in four algae of very different taxonomic position. It is suggested that the presence of thin and thick lamellae as well in the chloroplasts with grana as without grana, is a common, significant characteristic. Perhaps there is a functional difference between the two kinds of lamellae. The thick lamellae in the midst of the two thin lamellae in the Algae (and in the liverwort *Anthoceros*) are perhaps the "precursors" of the many thick lamellae in the so called grana of the higher plants.

### Literatur

- GRELL, K., u. K. WOHLFARTH-BOTTERMANN: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an dem Dinoflagellaten *Amphidinium elegans* n. sp. Z. Zellforsch. **47**, 7—17 (1957).
- HEITZ, E.: Zur Kenntnis des lamellaren Musters in ausgewachsenen und der Kristallgitterstruktur in jungen Chloroplasten. Experientia (Basel) **16**, 265—270 (1960). (Literatur.)
- LEFORT, M.: Structure fine du chloroplaste normal chez *Lycopersicum*: Liaisons grana-stroma. C. R. Acad. Sci. (Paris) **244**, 2957—2959 (1957).

Prof. Dr. EMIL HEITZ, Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, Corrensstr. 41



Department of Zoology, University of California, Berkeley

## CYTOCHEMICAL AND CYTOLOGICAL STUDIES OF THE PARIETAL EYE OF THE LIZARD, *SCELOPORUS OCCIDENTALIS*\*

By

RICHARD M. EAKIN, WILBUR B. QUAY, and JANE A. WESTFALL

With 18 Figures in the Text

(Received August 27, 1960)

The function of the third eye in lizards has long been a controversial subject. Not a few investigations, both old and new (ROTH and BRAUN 1958), have led some investigators to the conclusion that the organ is neither light nor temperature sensitive in the forms they tested. Behavioral studies by STEBBINS and EAKIN (1958) and GLASER (1958), however, suggest that the third eye in at least some lizards may function as a dosimeter of solar radiation. Recently EAKIN and WESTFALL (1959, 1960) and STEYN (1959a, 1960) discovered that the ultrastructure of its retinal cells is remarkably similar to that of rods and cones of the lateral eye. It seems probable, therefore, that this organ is light sensitive, although EAKIN and CRESITELLI (unpublished) were unsuccessful in demonstrating a photosensitive substance in a digitonin extract of over 100 parietal eyes of the Western Fence Lizard (*Sceloporus occidentalis*). The present study was undertaken to obtain further information on the organization of the third eye and on the effects of light, if any, upon its cytochemistry.

### Materials and general methods

The Western Fence Lizard, *Sceloporus occidentalis*, was secured in numbers of 6 to 10 at a time from the Berkeley hills by the use of a noose of copper wire (EAKIN 1957). The animals ranged in size from immatures to adults (range of snout-vent length: 37 to 70 mm). The parietal eye was prepared for cytochemical study as follows. An animal was decapitated, the interparietal scale and underlying integument removed, and two longitudinal incisions made in the meninges, one on each side of the eye by means of a microscalpel (BURCH 1942), to facilitate fixation. The head was then placed in 10% neutral buffered formalin, which was changed after one hour. Following fixation overnight the eye was extirpated by use of microscalpel and microscissors (EAKIN 1947), washed in water, dehydrated, embedded in paraffin, sectioned at  $3\ \mu$  and variously stained (see below).

Some animals were illuminated for 48 hours continuously with artificial light from a 6.5 volt miniature lamp. Although the intensity of the beam entering the eye was not accurately measured it was found to be slightly greater than that of sunlight. Such an experimental animal was immobilized on a block of wall board by adhesive tape and an enclosure of pins thrust into the board. To prevent illumination of the lateral eyes also, the mounted animal was placed in a black paper box, through the top of which a paper cone extended to the parietal eye. The light was directed through a water bath and down the cone to the eye. Control animals were similarly immobilized and enclosed in light-proof paper boxes arranged to permit ventilation of the inner chamber. Paired animals (illuminated

\* This investigation was supported by a grant-in-aid from the National Science Foundation (number 7097). We are grateful to Mrs. W. B. QUAY for collecting the animals; to Mr. VICTOR DURAN, University Photographer, for the light photomicrographs; and to Drs. DOROTHY R. PITELKA and ROBERT C. STEBBINS for reading the manuscript.

and dark-adapted), usually matched as to size and sex, were maintained at constant temperature (20° C) during the experiment. A few animals were exposed to direct sunlight for a few hours, during which time their temperature was kept below 30° C by a current of air from an electric blower. The eyes of experimental and control animals were fixed as described above, except that in the case of the latter (dark-adapted lizard) decapitation and removal of the cornea were conducted in a dark room under a photographic safe light (40 watt red bulb) and the eye was fixed in total darkness. The eye of the illuminated animal, on the other hand, was prepared and fixed in the light, artificial or sunlight whichever had been used. With the exception of experiments involving sunlight, in which illuminated and dark-adapted animals were not maintained at the same temperature and the former may have suffered some dehydration from the blower, an effort was made to keep all factors equal other than the presence or absence of light.

Disregarding animals used in preliminary experiments, a total of 23 illuminated and 21 dark-adapted eyes was studied. Additionally, eyes from 46 non-experimental animals were variously fixed and stained (see below), many of them in osmium tetroxide for electron microscopy according to procedures previously described (EAKIN and WESTFALL 1959, 1960).

## Specific methods and results

### 1. PAS-positive material

The periodic acid Schiff (PAS) technique (LILLIE 1954) was applied to sections of all light and dark-adapted eyes. The tissues were oxidized for 10 minutes followed by a 15-minute treatment with Schiff reagent. In a few instances the sections of an eye were mounted on two slides, one of which was incubated  $1\frac{1}{2}$  to 4 hours at 37° C in 0.1% alpha amylase in 0.01 M NaCl, and the other one in 0.01 M NaCl alone, before both were collodionized, oxidized and treated with leucofuchsin. Slides of control and experimental eyes were stained simultaneously.

In the dark-adapted eye (Fig. 1) there were many granules and strands of PAS-positive material in the lumen of the eye, particularly near or on the surface of the lens. The lens cells also possessed positive granules throughout their cytoplasm, usually more concentrated about the nuclei and in the proximal (luminal) parts of the cells than distally where they appeared to be distributed along the sides and beneath the outer (corneal) ends of the cells. The lenses of some specimens, such as the one shown in Fig. 1, gave a fairly uniform reaction. In other instances (see Fig. 3), however, some lens cells were positive, others negative. Frequently there was a globule of stainable material in the cavity of the eye immediately adjacent to a reactive cell. Within the retina, PAS-positive substance appeared as blobs or as thick walls of vesicles on the luminal side of the nuclei of the photoreceptors. These are not apparent in a black-and-white photomicrograph (Fig. 1). Under the microscope, however, they can be distinguished from pigment granules by their red color, albeit critical observation is difficult because of obscuration by pigment cells. Similar bodies and vesicles within the nervous layer of the retina were stained with leucofuchsin. Some of them may be seen in Fig. 1 (see arrows).

In over 70% of the light-adapted eyes there was a marked reduction in PAS-positive material in the lumen of the eye and in the lens cells. In some specimens (Fig. 2) these regions had only traces of stainable substance. The photomicrographs shown in Figs. 1 and 2 were taken under identical photographic conditions. Even without the benefit of color the reader can see a difference in the density of the two sections, from dark-adapted and light-adapted eyes respectively.



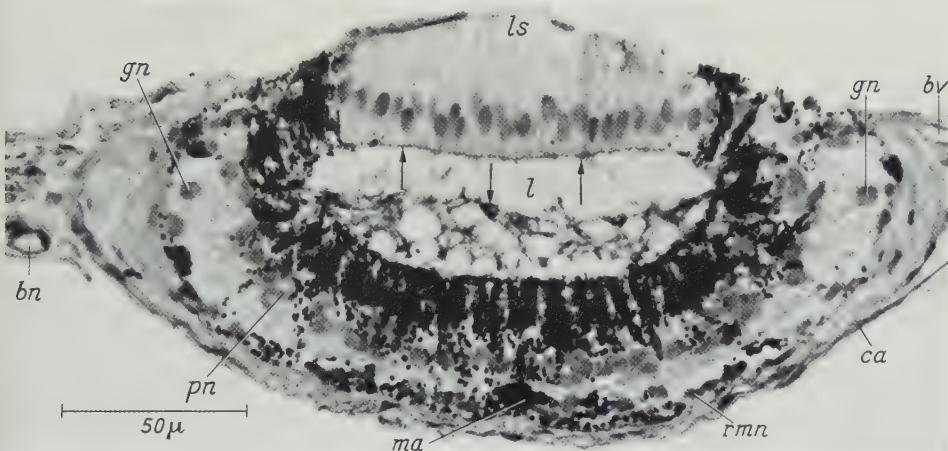
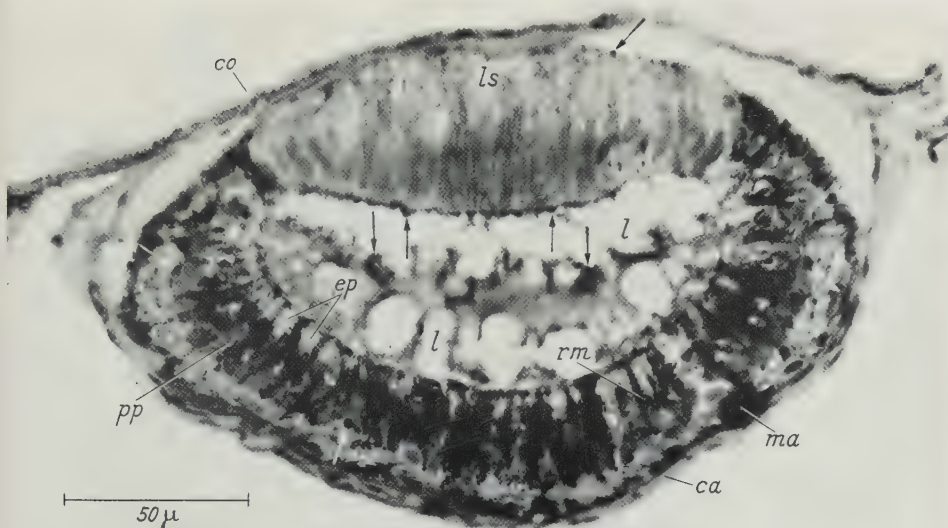


Fig. 1. PAS reaction in an eye dark-adapted for 48 hours before fixation (with light hematoxylin nuclear stain). Arrows point to strongly PAS-positive regions (pink or purple in color). See explanation under Fig. 2

Fig. 2. PAS reaction in an eye illuminated for 48 hours before fixation (with light hematoxylin nuclear stain). No structure strongly positive and only a few weakly stained (see arrows). *bv* blood vessel; *ca* capsule; *co* innermost part of cornea (outer layers removed); *ep* "ellipsoid" of photoreceptor; *gn* nuclei of ganglion cells; *l* lumen; *ls* lens; *ma* giant pigment cell (macrophage?); *pn* nuclei of photoreceptors; *pp* "paraboloid" of photoreceptor; *rm* retinal melanocyte; *rmn* nuclei of retinal melanocytes

Fig. 3. PAS reaction in lens and lumen of an eye dark-adapted for 48 hours. Certain cells only are positive; others are negative. Arrows indicate stainable material.

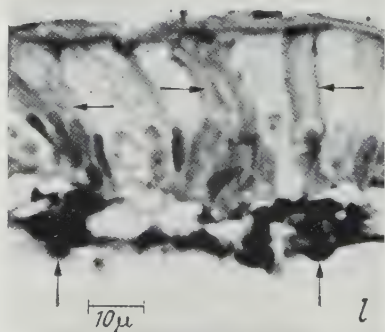


Fig. 3

Changes in the retina were variable. In many instances PAS-positive material in the photoreceptors was reduced in the illuminated eye, the vesicles above the

nuclei being clearer and showing thinner walls than those in the dark-adapted eye. Usually the positive vesicles in the nervous layer of the retina seemed little affected by light, although in some specimens, such as the one figured, very few were present.

It is difficult to express quantitatively the differences in PAS-staining of light and dark-adapted eyes. An effort was made, however, to assign to each eye a general rating on a 1 (low) to 5 (high) scale. The results were as follows. *Light-adapted eyes*: grade 1—11, grade 2—6, grade 3—4, grade 4—2, grade 5—0. *Dark-adapted eyes*: grade 1—0, grade 2—2, grade 3—3, grade 4—7, grade 5—9. It is apparent that there was considerable variation within both groups and that the two groups overlapped.

Sections treated with amylase, prior to oxidation and staining, showed a clear reduction to complete loss of stainable material in lumen, lens, and retina. Therefore, glycogen appears to be the primary PAS-positive substance in those areas. After amylase digestion only capsule and meninges were colored, although the lower border of the lens was sometimes faintly tinged. No color was imparted to the tissues by the Schiff reagent in nonoxidized sections. Also aldehyde blockade by one hour treatment with 5% phenylhydrazine hydrochloride after oxidation led to lack of staining of the parietal eye by leucofuchsin.

## 2. Lipoidal materials

Serial sections of the parietal eye of several non-experimental lizards were stained for lipids with oil red O and oil blue N dyes (LILLIE 1954). Additionally, a few sections were pretreated with the fat-solvent pyridine at 60° C for 12 hours before treatment with the above dyes.

The outer layer of the capsule of the parietal eye was intensely stained red, or blue by the oil red O and oil blue N respectively, giving it the appearance of a narrow colored band over the ventral and lateral surfaces of the eye (Fig. 4). At high magnification the band was seen to consist of irregular strands of red or blue granules. At the capsular-corneal junction, where the capsule is thicker than elsewhere, the stainable material was less strandlike and splotchy. Each spot was made up of densely packed granules. Other parts of the eye were negative to these two dyes, except that the luminal border of the retina was slightly stained. Positively reacting structures situated outside of the eye included the meninges, especially adjacent to the eye, and the dermis of the skin (the integument having been retained with the eye in a few instances), except for the cornea of the eye which was unstained. The lipids appeared to be contained in chromatophores (see discussion). Finally, the parietal nerve (Fig. 4) was covered with a thin layer of chromophilic material, at least in the vicinity of the eye, the only area examined. None of these structures was stained with either dye in sections pretreated with pyridine (Fig. 5).

## 3. Nucleic acids

Methyl green-pyronin (KURNICK 1955) and experimental cyanine red (QUAY 1957) were employed to reveal the distribution of nucleic acids. Prior to staining with methyl green-pyronin some slides were treated one hour at 37° C with 0.01% ribonuclease (prepared by Kunitz method, Worthington Biochemical



Corporation) in neutral distilled water after prior heating of the solution at 90° C for 10 minutes to remove the desoxyribonuclease. Other slides were immersed in distilled water alone for 1 hour at 37° C.

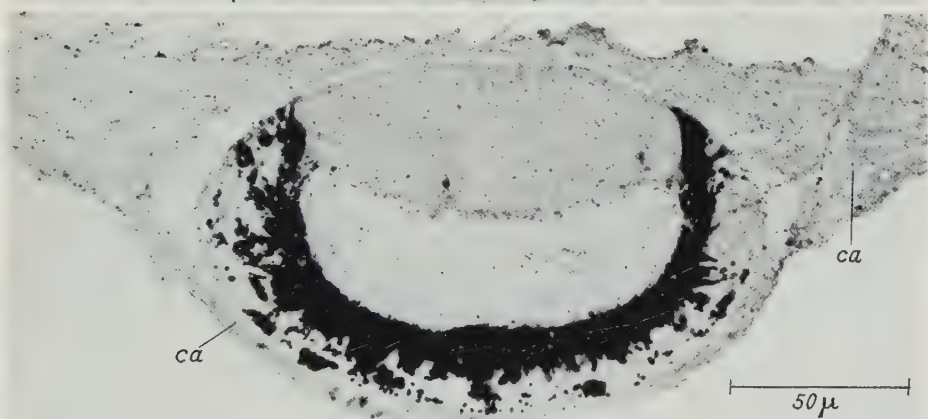
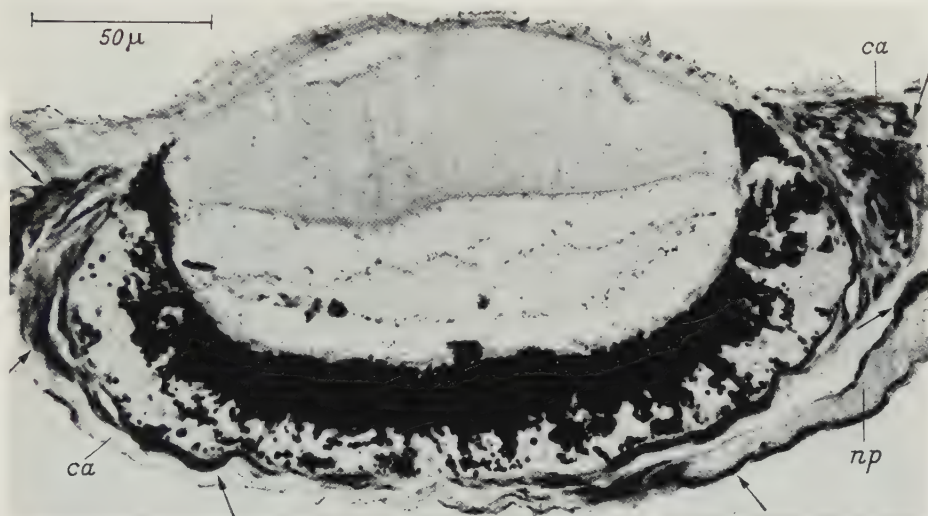


Fig. 4. Lipoidal material (see arrows) in capsule of eye and on parietal nerve stained with oil red O  
ca capsule; np parietal nerve

Fig. 5. Another section of the same eye as that in Fig. 4 treated with pyridine before staining with oil red O. Completely negative. ca capsule

All nuclei were stained with methyl green, owing presumably to their desoxyribonucleic acid content (Figs. 6 and 7). No other structure in the parietal eye was methyl green-positive except the chromatophores in the capsule. The inclusions in these cells were faintly tinged with green.

Structures staining with pyronin Y after treatment with ribonuclease (Figs. 6 and 8) were: the cytoplasm of erythrocytes and mast cells, fine granules in some of the connective tissue cells, occasional strands of luminal material, and the perinuclear regions of fibroblasts and slender lens cells. It is assumed that these enzyme-resistant materials do not contain ribonucleic acid.

Pyronin-positive and ribonuclease-labile structures (Figs. 7 and 9) were as follows. 1. Cytoplasmic granules in the lens. The granules were numerous about the lower or proximal poles of the lens nuclei, less abundant at the luminal

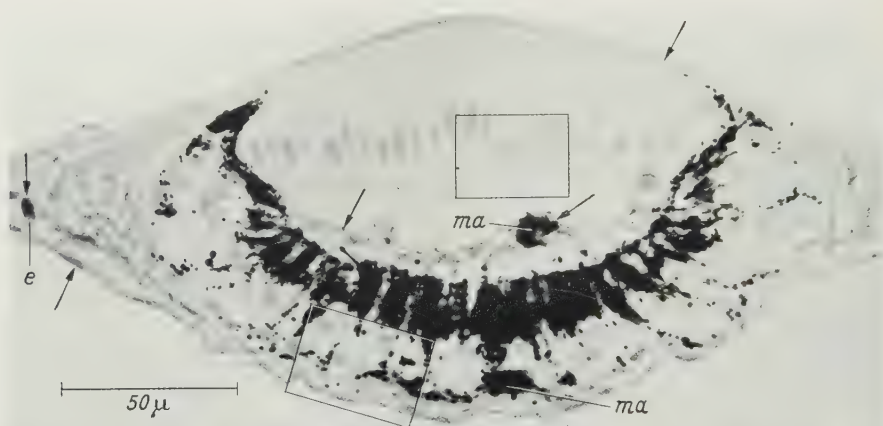


Fig. 6

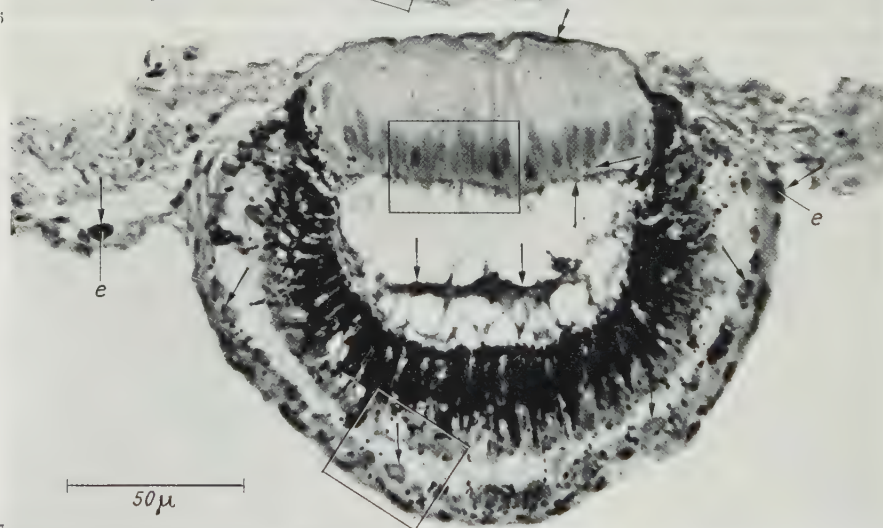


Fig. 7

Fig. 6. Eye (illuminated) stained with methyl green-pyronin after treatment with ribonuclease. Nuclei stain with methyl green. RNase-resistant pyronin-positive structures very few (see arrows). Enclosures indicate areas of lens and retina enlarged in Fig. 8

Fig. 7. Eye (illuminated) stained with methyl green-pyronin. Pyronin-positive material shown with arrows. Enclosures indicate areas of lens and retina enlarged in Fig. 9. *e* erythrocyte; *ma* giant pigment cell (macrophage ?)

border, and very sparse in the upper or distal half of the lens, except in the more slender cells. 2. Perinuclear material in the ganglion cells (see arrows in Figs. 7 and 9). The presence of red granules packed about the large nuclei of the ganglion cells permitted clear distinction of these neural elements from the other retinal cells. Aside from the perikarya of the ganglion cells, the so-called nervous layer of the retina was completely negative. 3. Cytoplasmic bodies in the photoreceptors. Small masses of stainable material were observed above



the nuclei of the sensory cells; sometimes an entire nucleus would be surrounded by a narrow red band. These features are unobservable in a black-and-white photomicrograph. The distal parts of the photoreceptors were unstained. 4. Variably positive strands within the lumen of the eye.

Essentially the same results were obtained with experimental cyanine red, a new stain for nucleic acids and acid mucopolysaccharides. We found no

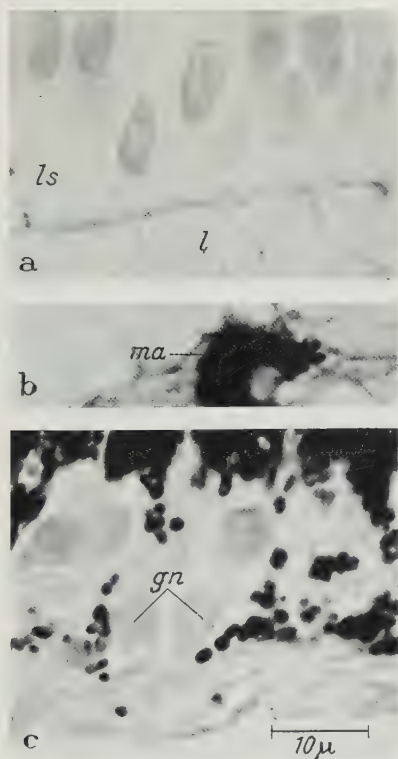


Fig. 8

Fig. 8a—c. High magnification of selected parts of (a) luminal border of lens, (b) lumen, and (c) nervous layer of the retina of the eye shown in Fig. 6. *gn* nucleus of a ganglion cell; *l* lumen; *ls* lens; *ma* giant pigment cell (macrophage?)

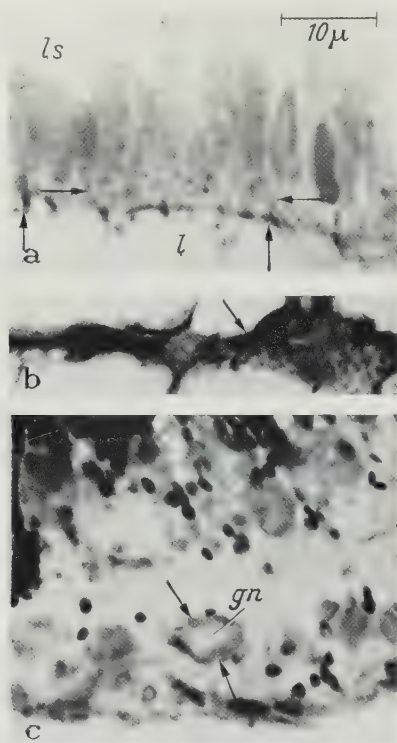


Fig. 9

Fig. 9a—c. High magnification of selected parts of (a) luminal border of lens, (b) lumen, and (c) nervous layer of the retina of the eye shown in Fig. 7. Pyronin-positive material indicated with arrows. *gn* nucleus of ganglion cell; *l* lumen; *ls* lens

consistent difference between illuminated and dark-adapted eyes with respect to material stained with methyl green-pyronin and experimental cyanine red.

#### 4. Metachromasia

Azure B and toluidine blue were used, following standard methods (see PEARSE 1960), to provide additional histochemical information. Structures staining metachromatically were as follows: 1. Luminal material. Strands, vesicles, blobs, and granules in the cavity of the eye and on the luminal surface of the lens were metachromatic (purple or violet in color). 2. Similarly reactive were the walls of vesicles within the nervous layer of the retina. 3. Irregular

bodies and walls of vesicles distal to the nuclei of the photoreceptors were weakly metachromatic. These vesicles and those just mentioned in the nervous layer of the retina appear to be the same as those observed in PAS preparations. 4. Granules and irregularly shaped bodies in the proximal parts of the lens cells, i.e., between the nuclei of the cells and the lumen of the eye, showed traces of metachromasia. 5. Bodies in the perikaryon of ganglion cells. 6. Cytoplasmic granules in mast cells commonly found on the ventral surface of the capsule or in the meninges adjacent to the eye.

A single pair only of illuminated and dark-adapted eyes was studied for metachromasia. No difference between the two eyes was observed.

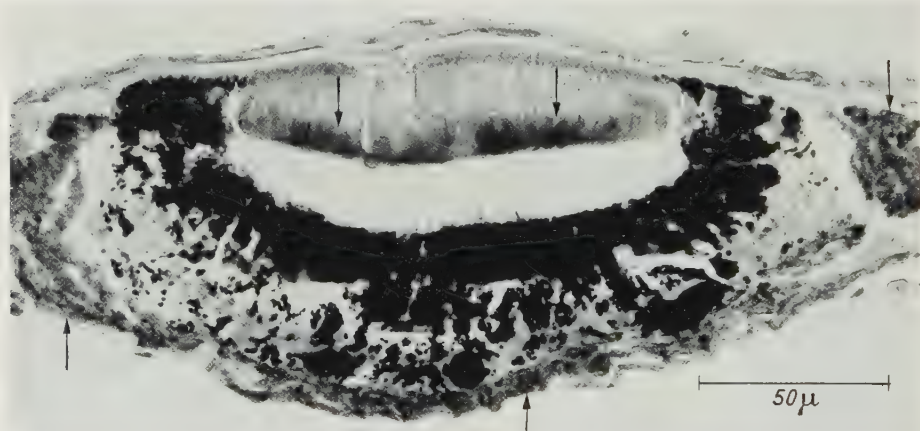


Fig. 10. Eye (normal light-adapted) fixed and stained with osmium tetroxide. Note strong binding of metal by luminal border of lens and by capsule (see arrows)

### 5. Miscellaneous techniques

Two eyes were fixed with chilled 40%  $\text{OsO}_4$  in  $\text{CCl}_4$  (AFZELIUS 1959) by dripping the fixative upon the exposed eye for 40 minutes, serially sectioned at  $3\mu$ , and mounted without further staining. The only noteworthy point is the pronounced binding of the heavy metal by the inner or proximal parts of the lens cells and by chromatophores in the capsule of the eye and in the meninges (see arrows in Fig. 10).

Serial sections of one eye stained by the methenamine silver technique (LILLIE 1954) for enterochromaffin were negative. Sections of rat colon, similarly fixed in 10% neutral buffered formalin and stained simultaneously, were positive. It may be noted, however, that the pigment granules in the retina were intensely blackened, likewise those in melanocytes on the meninges adjacent to the eye. Sections of another eye stained with diazosafranin (LILLIE 1954) revealed nothing of note.

### 6. Shift in retinal pigment

In most instances dark-adapted and illuminated eyes could be distinguished by noting the position of the pigment in sections of their retinas. The differences, however, were never dramatic and at times difficult to demonstrate. Figs. 1 and 2 illustrate a typical difference. In Fig. 1, showing an eye of an animal maintained



in total darkness for two days, one sees that the center of pigment concentration is in the middle stratum of the retina. In most of the cells the granules are not massed at the luminal ends. As a result there is an inner band of the retina, about one third of its thickness, bordering the lumen of the eye which contains fewer pigment granules than the middle third of the retina. In an eye illuminated for two days (Fig. 2), on the other hand, the center of concentration of pigment has shifted toward the cavity of the eye, and the innermost zone is as heavily pigmented as is the middle part of the retina. Moreover, the shift of pigment lumenward has largely uncovered the nuclei of the photoreceptors, whereas in the dark-adapted eye (Fig. 1) these nuclei are obscured to a considerable extent by pigment granules.

### Discussion

*Lens and humor.* It seems clear that the inner or proximal part of the lens cell, that is, between nucleus and luminal surface, is a region of high metabolic activity. This zone is strongly stained by the PAS reaction, osmium tetroxide, pyronin Y (but not following treatment with ribonuclease), experimental cyanine red, azure B, and toluidine blue. An exchange of material between lens and lumen is suggested. It appears also that light stimulates a lens-to-lumen movement of PAS-positive material. Small masses or droplets of humor, stained by leucofuchsin, seem to be closely associated with the under surface of the lens. This is particularly apparent in lenses in which some of the cells are negative and others positive: often there is a stainable drop of secretion (?) attached to the proximal ends of the latter. Further evidence that the inner zone of the lens of the parietal eye is metabolically active is indicated by the presence of many mitochondria in the same region (EAKIN and WESTFALL 1960). Moreover, new electron micrographs (Figs. 11 and 12) show that the cytoplasm of the lens cell proximal to the nucleus is more electron dense than that distal to the nucleus. One observes also numerous vesicles, which might be filled with secretion, situated at the luminal border of the lens cell and within the many microvilli extending into the cavity of the eye. It is possible, of course, that there is a two-way transfer system. Droplets may be moving by pinocytosis into the lens cells, especially since easy transport of materials to the lens from the capsule and cornea appears unlikely. The degree to which the lens cells chemically modify the interchanged substances is not known. We conclude from the absence of a PAS reaction following treatment with amylase and after aldehyde blockage by phenylhydrazine that glycogen is one of the constituents of the humor of the eye and that this carbohydrate is also present in high concentration in the proximal parts of the lens cells.

Glycogen has been demonstrated in the lens anlage of amphibian, chick, and human embryos but not in the lens disc or vesicle of the mouse (see O'RAHILLY and MEYER 1960). The mammalian vitreous humor is reported by DUKE-ELDER (1932) to have a small amount of sugar; no mention is made of glycogen. The vitreous humor of the lateral eye, however, is not secreted by the lens, except for a contribution to the primary vitreous body in an early stage of development (see WALLS 1942). In any event, the vitreous humor does not nourish the photoreceptors.

OKSCHE (1958) found large quantities of glycogen in the ependymal and glial cells of all classes of vertebrates. He studied especially those in the central

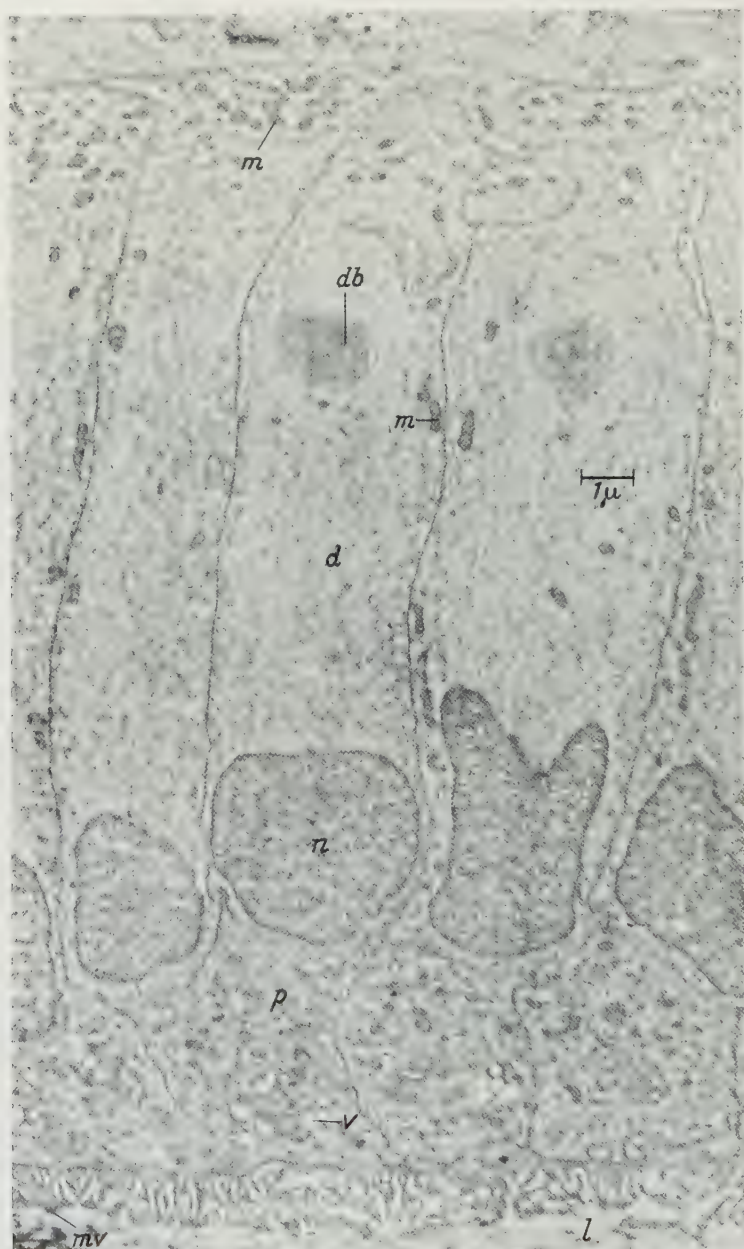


Fig. 11. Electron micrograph of lens cells. *d* distal part of cell, less dense and more fibrous than proximal region; *db* dense body of unknown nature; *l* lumen; *m* mitochondria; *mv* microvilli; *n* nucleus; *p* proximal part of cell, granular and electron dense; *v* vesicle

nervous system of the frog in which he showed that these cells, including those of the epiphysis, were especially rich in glycogen in the winter months. OKSCHE



postulated that the ependymal cells supply carbohydrate, the primary energy-yielding substrate for nervous tissue, to adjacent neurones. It may be noted also that the "pineal body" of a fish (*Astyanax mexicanus*) contains glycogen which develops under conditions of darkness and of constant light as well as under normal conditions, and that its amount in darkness and in constant light is less than that in alternating light and darkness (GRUNEWALD-LOWENSTEIN 1956). It was thought by this investigator that the glycogen was transferred from the pineal cells to the lumen by a process of apocrine secretion. Now the

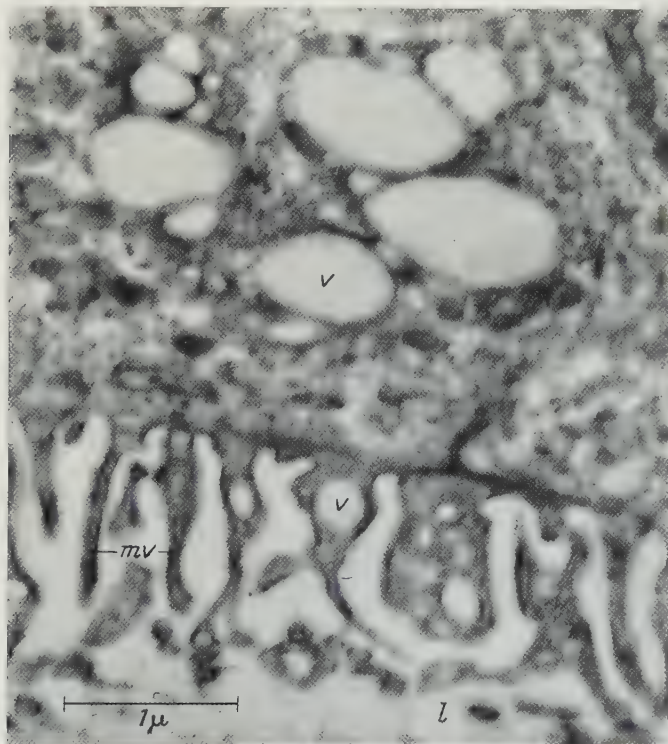


Fig. 12. Higher magnification of lower border of lens to show microvilli (*mv*), vesicles (*v*), and lumen (*l*)  
El. micr.

lens of the parietal eye, unlike that of the lateral eye, is derived from the ependymal layer of the embryonic neural tube (several works including NOWIKOFF 1910, TROST 1953, STEYN 1959b). That the lens is the source of the humor in the third eye of the lizard is not a new concept. NOWIKOFF (1910) and TROST (1953) suggested that both lens and retina secrete the humor, although the former presented little evidence for his conclusion. TROST (1953) and STEYN (1959b) described and figured an apocrine secretory process of the sensory cells of the retina which will be discussed later. The fibrous reticulum, according to STEYN, is an outgrowth of immature pigment cells in the early development of the eye.

From the results of methyl green-pyronin and experimental cyanine red staining we draw the further conclusion that the humor and the lower parts of

the lens cells contain also considerable amounts of nucleic acid. That it is RNA is indicated by the disappearance of the pyronin-positive substances with ribonuclease digestion. Moreover, the metachromatic coloration of these regions with azure B and toluidine blue may be owing to RNA or mucopolysaccharides. Additionally, some of our electron micrographs (not figured here) show piles of granular membranes (ergastoplasm) on or near the lower poles of the lens-cell nuclei. Ergastoplasm is known to be rich in RNA (see HAGUENAU 1958). Parenthetically, SCHAEFFER (1951) reported the presence of ribonucleoproteins in

the mammalian lens. The presence of considerable amounts of RNA in the luminal ends of the lens cells of the parietal eye suggests a center of protein synthesis.

The distal parts of the lens cells were relatively negative to the histochemical procedures used by us, except for a moderately positive PAS reaction in dark-adapted eyes. The leucofuchsin-stained granules or droplets were found in the outer half of the lens along lateral cell membranes and beneath the distal surfaces of the cells, that is, adjacent to the cornea of the eye. In an electron micrograph (Fig. 11) one observes that the distal half of the lens cell is characterized by a large fibrous mass with a dense spherical body at its center and a narrow band of cytoplasm subjacent to the lateral and distal cell membranes which contains many mito-

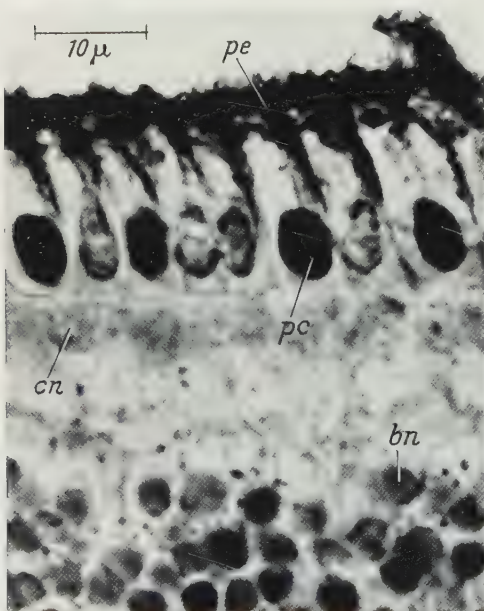


Fig. 13. PAS-positive paraboloids (pc) in cones of lateral eye of *Sceloporus occidentalis*. bn nuclei of bipolar neurons; cn nuclei of cones; pe pigment epithelium

chondria, vesicles and granules. It is the latter, the periphery of the distal part of the cell, which is especially PAS-positive.

The function of the humor in the third eye is not clear. It is tempting to speculate, however, that it nourishes the receptor processes of the retina which protrude into the cavity of the organ. These in *Sceloporus occidentalis* have been described in detail by EAKIN and WESTFALL (1959, 1960) who showed them to resemble those of the rods and cones of the vertebrate lateral eye. In the paired eye, however, the outer segments of the photoreceptors are relatively close to the capillary bed of the choroid from which they probably obtain nutrients. SIDMAN (1958) conducted a histochemical study of the interstitial zone between the retinal pigment epithelium and the outer segments of the photoreceptors in the mouse's eye. He described PAS-positive and metachromatic components (granules, fibrils, and matrix) which he concluded were glycoproteins and acid mucopolysaccharides. In view of the fact that the photoreceptor layer of the mammalian retina is avascular these substances probably



represent metabolites interchanged between the rods and the cones and the blood in the chorioidal capillaries. BECKER (1960) has recently described fine tubules and fluorescing granules in the processes of the pigment epithelial cells in the human eye which he thinks may transport metabolites to the outer segments of the photoreceptors.

In the parietal eye, on the other hand, the topography of the retina is the reverse of that of the lateral eye. The receptor processes of the former lie on the inner (luminal) instead of outer surface of the retina. The nearest capillaries are those in the capsule of the eye; the retina is non-vascularized. The humor which bathes both outer and inner segments of the receptor processes would provide a ready source of metabolites. Further support for this interpretation is afforded by our observation that there is a diminution of PAS-positive material in the humor and lens in over 70% of the light-adapted eyes. Perhaps these reservoirs of energy-rich substance become depleted by the continuous stimulation of the photoreceptors for two or three days.

*Photoreceptors.* Stainable material in the photoreceptors is localized immediately distal (luminal) to the nuclei of these cells. This region corresponds roughly to the so-called paraboloid of cones of the lateral eye as described by the light microscopist. It is noteworthy that glycogen was the only substance which SIDMAN and WISLOCKI (1954) could demonstrate in the cone paraboloid of various vertebrates. We have also found a strongly PAS-positive paraboloid

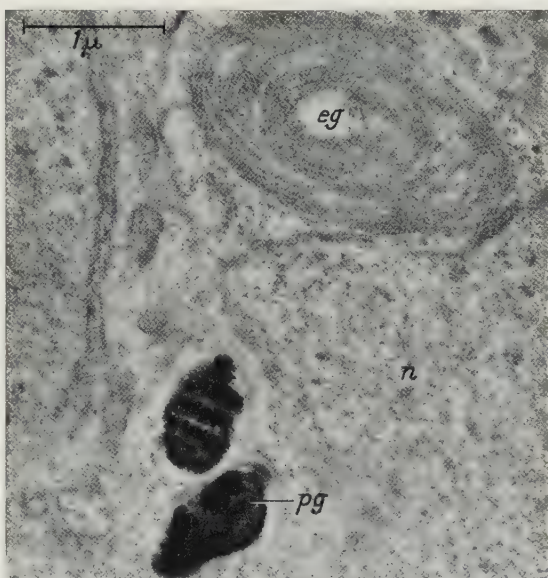


Fig. 14. Ergastoplasmic nebenkern (*eg*) on distal pole of photoreceptor nucleus (*n*). *pg* pigment granules in adjacent retinal melanocyte. El. micr.

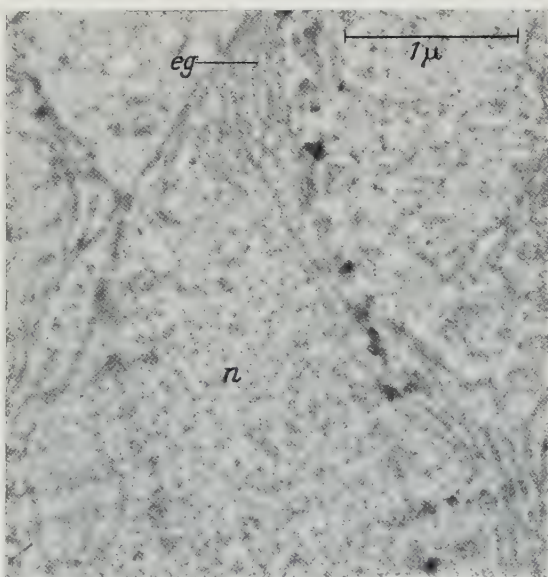


Fig. 15. Ergastoplasmic membranes (*eg*) adjacent nucleus (*n*) of photoreceptor. El. micr.

in the cones of the lateral eye of *Sceloporus occidentalis* (Fig. 13). This similarity in the cytochemistry of the cone and the parietal eye receptor together with certain other similarities (EAKIN and WESTFALL 1959, 1960) suggests that the receptors of the third eye of the lizard are more conelike than rodlike. Electron micrographs of the "paraboloid" region of the parietal eye receptor show a large organelle, an ergastoplasmic nebenkern (HAGUENAU 1958) consisting of a whorl of double-layered membranes bearing granules (Fig. 14), and an aggregation of vesicles and agranular membranes which has been tentatively designated a Golgi apparatus (EAKIN and WESTFALL 1960). It is possible that the PAS-positive vesicles here reported do not represent true vesicles but reactive cytoplasm surrounding these organelles. Additionally, we found that the nucleus was enclosed by a narrow leucofuchsin-positive band. Electron microscopy (Fig. 15) shows that the nucleus is enveloped by several layers of ergastoplasmic membranes. Perhaps glycogen lies just beyond, if not within, this perinuclear ergastoplasm as in the case of very active liver cells (BERNHARD and ROUILLER 1956) and in the cone paraboloid of *Pleurodeles* (CARASSO 1960). YAMADA (1960) recently reported in a preliminary note that the paraboloid of cones in the turtle retina is a large spherical glycogen body (PAS-positive), the fine structure of which consists of a core of particles and a periphery of circumferentially arranged membrane-limited tubules that are continuous with the endoplasmic reticulum. From YAMADA's brief description it appears as though the paraboloid of the turtle's cone might be similar to the whorled nebenkern of the parietal eye photoreceptor. CARASSO's (1960) electron micrographs of cone paraboloids of *Pleurodeles* and the turtle show, however, a different organization, the double-layered membranes being loosely arranged rather than in a tight whorl and showing disorganization in the center of the organelle.

Weakly metachromatic and pyronin-positive vesicles, like those stained with leucofuchsin, were also observed distal to the nucleus. Similarly the nucleus was encircled with pyronin-stainable ribonuclease-labile material. From these facts we infer that RNA is present on or about the perinuclear ergastoplasm and the adjacent nebenkern. WISLOCKI and SIDMAN (1954) found nucleoproteins in approximately the same region of the photoreceptor of the lateral eye. The "paraboloid" of the sensory cell of the parietal eye is not especially rich in mitochondria. They are concentrated lumenward in the "ellipsoid" region (EAKIN and WESTFALL 1959, 1960) which is similar in this respect to the so-called ellipsoid of the rod and cone of the paired eye. We conclude that the perinuclear and the "paraboloid" regions of the photoreceptor of the third eye are centers of carbohydrate and protein synthesis. Perhaps the products move distally to the "ellipsoid" where they are utilized in the formation of more specific substances, such as opsin and retinene, required to maintain the structure and function of the outer segments of the sensory cells.

We find no evidence of secretion by the retina into the cavity of the eye. The luminal ends of the sensory cells and their processes were essentially negative to the stains which we used. TROST (1953) and STEYN (1959b), however, described and figured an apocrine secretion of the sensory cells of the parietal eye of several species of reptiles. The variable appearance of the outer segments of the processes was attributed to cyclic phases of secretory activity. These studies need



to be reappraised in the light of the discovery of the true nature of the outer segments with the electron microscope (EAKIN and WESTFALL 1959, STEYN 1959a), namely, that they consist of a stack of several hundred discs or flattened sacs like those in the outer segments of rods and cones of the vertebrate lateral eye. It appears, therefore, that the features described by TROST and STEYN suggesting apocrine secretion were artifacts — the disorganized photoreceptor apparatus. This is not to say that there is no secretory activity whatsoever. Merocrine secretion into the lumen or the release of hormones which find their way into the capillaries in the capsule are neither contraindicated nor supported by our study.

Evidence of lipids in the photoreceptors of the parietal eye was, at best, a faint tinge of color imparted by oil red 0 to the luminal surface of the retina. Failure to demonstrate significant lipoidal contents in the sensory cells may have been due to loss of such materials in dehydration and paraffin embedding. Lipid has been described in the outer segments, ellipsoids, and myoids of the lateral eye receptors of various vertebrates (WISLOCKI and SIDMAN 1954, SIDMAN and WISLOCKI 1954). Moreover, our electron micrographs show small ovoid bodies in the sensory cells of the third eye of *Sceloporus occidentalis* which we interpret to be lipid droplets, and very large drops were found in the inner segments of the same cells in the Granite Night Lizard, *Xantusia henshawi* (EAKIN and WESTFALL 1960). Sections of the eye of the latter form were unfortunately not available for staining with oil red 0.

*Retinal melanocytes.* The histochemical procedures which we used do not contribute greatly to our knowledge of the pigment cells of the parietal eye retina. STEYN (1959b) described the pigment in the third eye of *Cordylus polyzonus* as "red brown granules in contrast to the usually darkbrown colour of dermal and other pigment" (p. 321). In *Sceloporus occidentalis* the pigment granules in sheath cells, macrophages, dermal melanocytes, and parietal eye have the same appearance under light and electron microscopes. Moreover, the pigment in the retina of the eye and in dermal melanocytes was similarly blackened with methenamine silver, a characteristic of mammalian melanin. It may be assumed, therefore, that the pigment is melanin until contrary evidence is obtained. The granules and spindle-shaped rodlets in the pigment epithelium of the retina of the vertebrate lateral eye contain a light brown form of melanin called fuscine (WALLS 1942).

The shift in retinal pigment in the parietal eye of *Sceloporus occidentalis* — basad in dark-adaptation and distad under strong illumination — is clear, although not marked as is the movement of pigment in the lateral eyes of fishes and amphibians (WALLS 1942). NOWIKOFF (1907, 1910) was the first to observe this photoresponse of the melanocytes of the third eye in two European reptiles, *Lacerta agilis* and *Anguis fragilis*. His observations on *Anguis* were confirmed by TROST (1953). Earlier efforts in this laboratory by EAKIN and STEBBINS (unpublished) to demonstrate photomechanical changes in the parietal eye of *Sceloporus occidentalis* and of the Side-blotched Lizard, *Uta stansburiana*, were unsuccessful, owing probably to the fact that artificial illumination used was not sufficiently strong to evoke a clear response. At best the difference between light and dark-adapted eyes of the Western Fence Lizard (see Figs. 1 and 2) is

not striking and considerably less than that observed by NOWIKOFF (1910) who reported that in the light-adapted eye of the forms he studied almost all of the pigment was concentrated at the distal ends of the cells, i.e., adjacent to the cavity of the eye, and that upon dark adaptation, the luminal border of the retina became almost devoid of pigment.

The photomechanical responses in the pigment epithelium of the lateral eye of vertebrates, except mammals in which there is no shift in pigment (WALLS 1928), have adaptive significance, especially in fishes and amphibians in which pupillary mobility is absent or poorly developed (WALLS 1942). The movement of pigment together with the extension or contraction of the myoids of the photoreceptors leads to a shielding of the outer segments of the highly sensitive rods in bright light and to their uncovering in dim light. No such function is possible in the parietal eye because both outer and inner segments of the sensory cells extend into the lumen and beyond the distal limits of the retinal melanocytes. The only portion of the photoreceptor which would be masked or exposed in bright and dim light respectively is the "ellipsoid" region (see Figs. 1 and 2). As indicated above this part of the receptor is undoubtedly important metabolically — witness the concentration of mitochondria here — and it may be that the photomechanical shift in pigment is significant in relation to some light-sensitive biochemical reaction in the "ellipsoid". The mechanism by which the pigment granules in the parietal eye are moved is unknown, as is the case also of causation of photomechanical changes in the lateral eye (WALLS 1942).

*Neural structures.* Irregular masses in the perikarya of ganglion cells were stained with pyronin and weakly metachromatically with azure B. We conclude, therefore, that the cell bodies of these neurones are rich in RNA. In an electron micrograph (Fig. 16) of a portion of the nervous layer and capsule of an eye one sees a layer of electron dense material (*ns*) about the nucleus (*n*) of a ganglion cell. It consists of membranes, vesicles and granules. The picture compares favorably with the description of the fine structure of Nissl substance in the perikaryon of the dorsal root ganglion cell in the rat (PALAY and PALADE 1955). Accordingly, we infer that the ganglion cells in the parietal eye contain Nissl substance, particularly concentrated about their nuclei. Mitochondria (*m*) are typically absent from this perinuclear region; they are abundant in the peripheral parts of the cell body. Whorled nebenkerns have not been observed in the ganglion cells in *Sceloporus occidentalis*, but EAKIN and WESTFALL (1960) observed them in the same cells in the third eye of *Xantusia henshawi*.

The nervous layer of the retina, aside from the ganglion cells, was completely unstained in methyl green-pyronin preparations, although membraneous whorls (see upper insert, Fig. 16) were found in many large nerve fibers. These whorls appear granular and thus similar to the ergastoplasmic nebenkerns in the photoreceptors (Fig. 14). PAS-positive vesicles, however, were noted in the nervous layer. Perhaps they represent glycogen on the surfaces of these whorls. It is not yet known whether the fibers with whorls are the axons of the photoreceptors or the dendrites or axons of ganglion cells (EAKIN and WESTFALL 1960).

*Capsule.* The capsule of the parietal eye of *Sceloporus occidentalis* consists of an inner layer of connective tissue and an outer layer of flattened cells filled with rows of exceedingly electron dense rodlets (Fig. 16). We tentatively



designated the latter cells iridocytes (EAKIN and WESTFALL 1960), assuming that the rodlets were composed of guanine owing to the silvery appearance of the cells and because the rodlets seemed to be shattered in our electron micrographs,

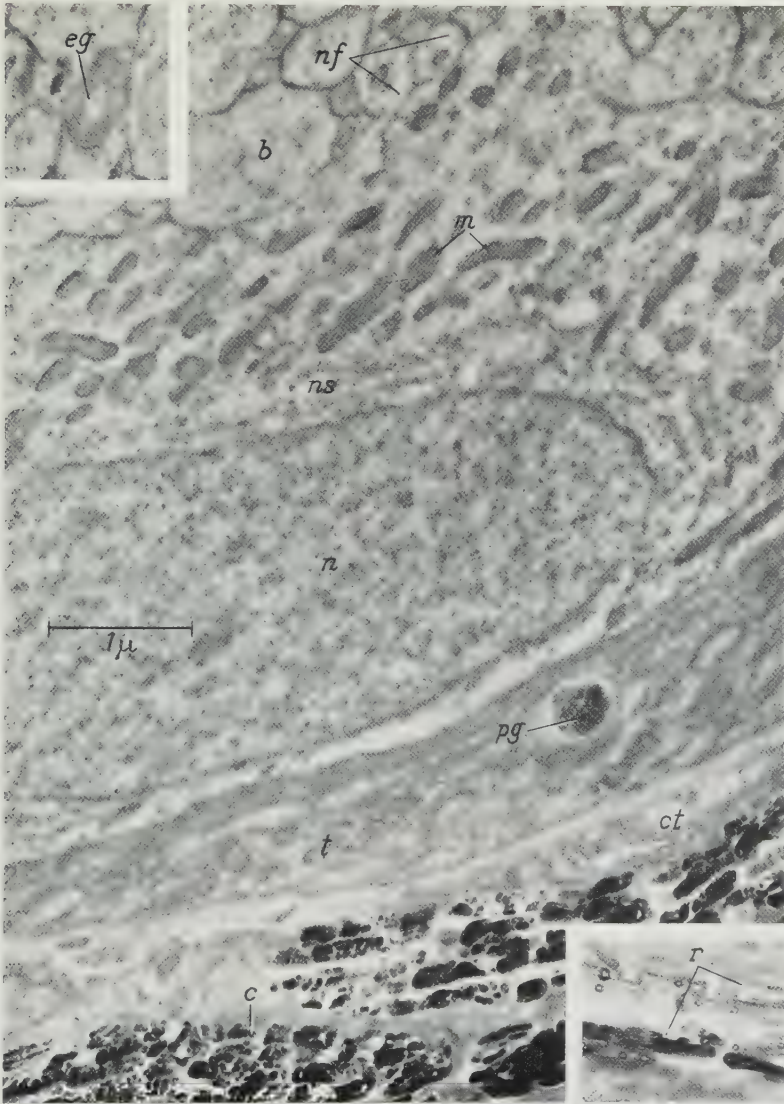


Fig. 16. Part of nervous layer and capsule of eye. Upper insert: nerve fibers from another part of section. Lower insert: piece of capsule from another specimen. *b* bouton of an axon in apparent synaptic relationship with perikaryon of ganglion cell; *c* chromatophore in outer layer of capsule; *ct* connective tissue part of capsule; *eg* ergastoplasmic whorl in a large nerve fiber; *m* mitochondria; *n* nucleus of ganglion cell; *nf* nerve fibers; *ns* Nissl substance; *pg* pigment granule; *r* rodlets in capsular chromatophore; *t* trumpet (basal piece) of retinal melanocyte. EL. micr.

suggesting a crystalline nature. Moreover, silvery tapeta, retinal and choroidal, in the lateral eyes of vertebrates are known to contain guanine (WALLS 1942, DETWILER 1943). The fact, however, that the capsule of the third eye was selectively stained with oil red O and oil blue N dyes, indicating the presence of

lipids, raises the question whether the chromatophores are iridocytes (guano-phores) or lipophores, or contain materials characteristic of both. There is another possibility that both kinds of cells occur together, although we find no indication of more than one type of chromatophore in the capsule of the eye.

There are two points of evidence that the silvery cells of the capsule are the same structures which bind the lipid-staining dyes used in this study. In the Western Fence Lizard about one animal in four or five lacks these chromatophores on its third eye, the under surface of the organ being dull black. We stained sections of two of these non-silvery eyes with oil red O. They were completely negative, as though they had been pretreated with the lipid solvent pyridine (Fig. 5). Secondly, we extirpated an eye with silvery capsule, fixed it in formalin, and then treated it with pyridine at 60° C for 20 hours. The silvery appearance of the capsule disappeared entirely. The eye was then stained in OsO<sub>4</sub>, embedded in methacrylate, sectioned, and examined under the electron microscope. The rodlets were gone, their places being marked by empty spaces.

These findings together with the osmophilic nature of the chromatophores suggest that they are lipophores, although the presence of guanine is not disproved. The guanine and lipid might be bound together in some sort of complex. The broken appearance of the rodlets may be due not to fragmentation but to dissolution of some of the material by solvents. There is considerable variation in this picture from specimen to specimen and indeed even among the rodlets in a single cell. Some appear as uniformly black bodies rounded at the tips; others seem to contain irregular granules and vesicles unevenly stained with osmium tetroxide; still others look like empty rectangular boxes (see lower insert, Fig. 16).

The cells of the tapetum lucidum of the cat have been studied recently with the electron microscope by BERNSTEIN and PEASE (1959). The tapetal cells contain many long slender rods arranged in regular brick-like rows. The investigators concluded that the rods do not contain guanine because the tapetum was not silvery and because the rods did not exhibit the close packing expected of crystalline structures. They suggested that the rods were modified melanin granules because of the presence of typical choroidal melanin granules in the tapetal cells as well as granules of intermediate shape in nearby melanocytes.

Further studies are needed to determine the nature of the capsular chromatophores of the parietal eye.

*Luminal cells.* Many workers have reported whole cells in the cavity of the developing and adult parietal eye, but there has been a division of opinion as to whether they arise from retina or lens (or both) or whether they are mesodermal derivations which invade the eye from outside (see discussions by TROST 1953 and STEYN 1959b). STEYN (1959b) has given particular attention to these cells in the third eye of *Cordylus polyzonus*, which is like *Sceloporus occidentalis* in having luminal cells with many pigment granules. As noted above STEYN holds that these cells "are distinguished from the chromatophores by their shape which is often spherical, and by the shape and colour of their red-brown pigment granules" (p. 323). He goes on to postulate that they are retinal pigment cells which have escaped into the lumen of the eye. He speculates further that after illumination, during which vitamin D may accumulate in their cytoplasm, they



migrate outside of the eye, thus transporting newly formed substances to the circulatory system. He finds similar cells in the blood vessels and in the connective tissue near the organ. STEYN calls attention to rounded pigment cells in the outer layer of the retina, i.e., adjacent to the capsule of the eye, which may be approaching migration into the lumen or to the outside.

We propose another interpretation, namely, that the luminal cells are macrophages which have accumulated pigment granules. Our evidence is admittedly

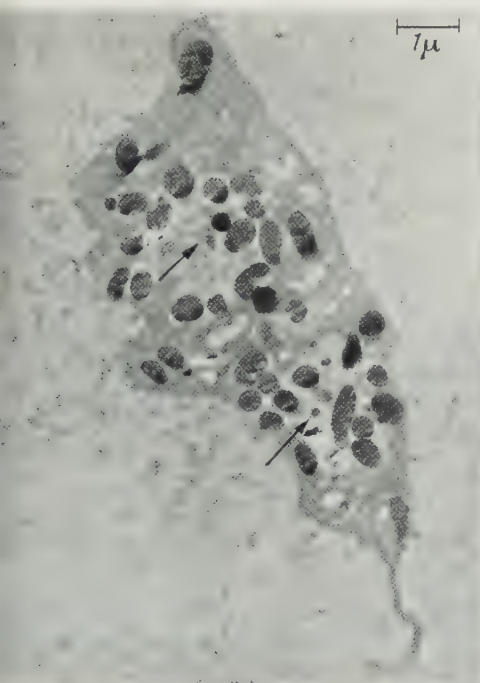


Fig. 17

Fig. 17. Luminal cell (macrophage?) bearing pseudopodia-like extensions, vacuoles, and many melanin granules, some of which seem to be broken down (see arrows). El. micr.

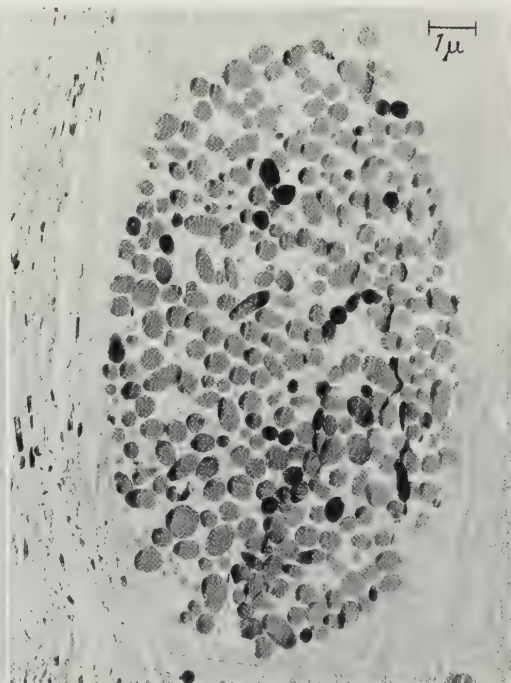


Fig. 18

Fig. 18. Giant oval-shaped cell packed with melanin granules in the periphery of the retina adjacent to the capsule (at left). El. micr.

tenuous. Electron micrographs show that the luminal cells are very irregular in shape, and that they possess pseudopodia-like extensions (Fig. 17). In these respects they resemble cells outside the eye which we regard as macrophages. Moreover, we observed that both luminal cells and macrophages contain pyronin-positive cytoplasmic material, even after digestion with ribonuclease. The luminal cell shown in Figs. 6 and 8, for example, is distinctly pyronin-positive, giving the pigment granules a reddish-brown cast, whereas those in the retina appear dark brown or black. Macrophages commonly ingest pigment granules, and according to NIU and TWITTY (1950), although unconfirmed by DUNCAN (1960), macrophages may transform into melanophores in the amphibian larva. We agree with STEYN in the observation of rounded giant pigment cells in the retina, but we have no information as to whether they too resemble macrophages. In con-

centration of pigment they appear to be different, having an exceedingly large number of melanin granules (Fig. 18).

In an electron microscope study of melanocytes of the human epidermis CHARLES and INGRAM (1959) pointed out that phagocytes "seem to have their pigment granules in vacuoles, rather than surrounded directly by the cytoplasmic matrix as in the melanocytes" (p. 41). Our micrographs do not permit a distinction between the luminal cells and the retinal melanocytes in this feature, although the luminal cell shown in Fig. 17 presents a suggestion of pigment granules, entire and fragmented (see arrows), within large vacuoles.

### Summary

1. Illuminated and dark-adapted parietal eyes of 44 Western Fence Lizards, *Sceloporus occidentalis*, were studied cytochemically. Additionally, the eyes of 46 non-experimental animals were variously fixed and stained, many of them with 1% osmium tetroxide for electron microscopy.

2. Glycogen, demonstrated by the periodic acid Schiff (PAS) reaction, was more abundant in dark-adapted eyes and occurred particularly in the basal (luminal) half of the lens, the humor of the eye, "paraboloid" and perinuclear regions of photoreceptors, and "vesicles" in the nervous layer. Illuminated eyes showed a decrease in PAS-positive material, especially in lens and lumen. It is concluded that the lens secretes glycogen and perhaps other polysaccharides into the cavity of the eye and that possibly these substances may be used by the photoreceptoral processes.

3. Oil red O and oil blue N revealed pyridine-soluble lipids in the chromatophores of the capsule of the eye. These chromatophores appear to have characteristics of both lipophores and guanophores.

4. Staining with methyl green-pyronin showed desoxyribonucleic acid in nuclei and ribonucleic acid (RNA) in the following: basal (luminal) part of lens cytoplasm, the luminal humor, "paraboloid" and perinuclear regions of photoreceptors, and perikarya of ganglion cells. The RNA in ganglion cells is identified with Nissl substance. There was no apparent difference in RNA content of light and dark-adapted eyes.

5. Metachromasia to azure B and toluidine blue was observed in the RNA-positive regions of lens, lumen, and retina.

6. Osmium tetroxide was bound especially by the basal (luminal) ends of lens cells and by some of the cytoplasmic granules in capsular chromatophores.

7. Melanin pigment in the retinal melanocytes was observed to shift lumenward in a 48-hour illumination of the eye and to retreat basally during dark-adaptation.

8. It is suggested that the luminal melanin-bearing cells may be macrophages.

### References

- AFZELIUS, B.: Electron microscopy of the sperm tail. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 269—278 (1959).  
BECKER, H.: Elektronenoptische Untersuchungen am Pigmentepithel der menschlichen Retina. In: *Vierter Internationaler Kongreß für Elektronenmikroskopie*, 2, S. 452 bis 455. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.



- BERNHARD, W., and C. ROUILLER: Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, Suppl. 73—77 (1956).
- BERNSTEIN, M. H., and D. C. PEASE: Electron microscopy of the tapetum lucidum of the cat. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 35—39 (1959).
- BURCH, A. B.: A microscalpel for use in experimental embryology. *Science* **96**, 387—388 (1942).
- CARASSO, N.: Rôle de l'ergastoplasme dans l'élaboration du glycogène au cours de la formation du «paraboloïde» des cellules visuelles. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **250**, 600—602 (1960).
- CHARLES, A., and J. T. INGRAM: Electron microscope observations of the melanocyte of the human epidermis. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 41—44 (1959).
- DETWILER, S. R.: Vertebrate photoreceptors. New York: Macmillan & Co. 1943.
- DUKE-ELDER, W. S.: Text-book of ophthalmology, vol. I. London: Henry Kimpton 1932.
- DUNCAN, J. T.: Studies on the reported transformation of melanophages into melanophores in *Taricha torosa*. *Anat. Rec.* **137**, 351 (1960).
- EAKIN, R. M.: Determination and regulation of polarity in the retina of *Hyla regilla*. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **51**, 245—272 (1947).
- Use of copper wire in noosing lizards. *Copeia* No 2, 148 (1957).
- , and J. A. WESTFALL: Fine structure of the retina in the reptilian third eye. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 133—134 (1959).
- — Further observations on the fine structure of the parietal eye of lizards. *J. biophys. biochem. Cytol.* **8**, 483—499 (1960).
- GLASER, R.: Increase in locomotor activity following shielding of the parietal eye in night lizards. *Science* **128**, 1577—1578 (1958).
- GRUNEWALD-LOWENSTEIN, M.: Influence of light and darkness on the pineal body in *Astyanax mexicanus* (FILIPPI). *Zoologica (N.Y.)* **41**, 119—128 (1956).
- HAGUENAU, F.: The ergastoplasm: Its history, ultrastructure, and biochemistry. *Int. Rev. Cytol.* **7**, 425—483 (1958).
- KURNICK, N. B.: Pyronin Y in the methyl-green-pyronin histological stain. *Stain Technol.* **30**, 213—230 (1955).
- LILLIE, R. D.: Histopathologic technic and practical histochemistry. New York: The Blakiston Co. 1954.
- NIU, M. C., and V. C. TWITTY: The origin of epidermal melanophores during metamorphosis in *Triturus torosus*. *J. exp. Zool.* **113**, 633—647 (1950).
- NOWIKOFF, M.: Über das Parietalauge von *Lacerta agilis* und *Anguis fragilis*. *Biol. Zbl.* **27**, 364—370 (1907).
- Untersuchungen über den Bau, die Entwicklung und die Bedeutung des Parietalauges von Sauriern. *Z. wiss. Zool.* **96**, 118—207 (1910).
- OKSCHE, A.: Histologische Untersuchungen über die Bedeutung des Ependyms, der Glia und der Plexus chorioidei für den Kohlenhydratstoffwechsel des ZNS. *Z. Zellforsch.* **48**, 74—129 (1958).
- O'RAHILLY, R., and D. B. MEYER: The periodic acid-Schiff reaction in the cornea of the developing chick. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **121**, 351—368 (1960).
- PALAY, S. L., and G. E. PALADE: The fine structure of neurons. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 69—88 (1955).
- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied, 2nd. edit. Boston: Little, Brown & Co. 1960.
- QUAY, W. B.: Experimental cyanine red, a new stain for nucleic acids and acid mucopolysaccharides. *Stain Technol.* **32**, 175—182 (1957).
- ROTH, C., u. R. BRAUN: Zur Funktion des Parietalauges der Blindschleiche *Anguis fragilis* (Reptilia; Lacertilia, Anguidae). *Naturwissenschaften* **45**, 218—219 (1958).
- SCHAEFFER, A. J.: Some problems of protein chemistry of the eye. *Docum. ophthalm. ('s-Grav.)* **5/6**, 403—451 (1951).
- SIDMAN, R. L.: Histochemical studies on photoreceptor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **74**, 182—195 (1958).
- , and G. B. WISLOCKI: Histochemical observations on rods and cones in retinas of vertebrates. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 413—433 (1954).

- STEBBINS, R. C., and R. M. EAKIN: The role of the "third eye" in reptilian behavior. *Amer. Mus. Novitates* No. 1870, 1—40 (1958).
- STEYN, W.: Ultrastructure of pineal eye sensory cells. *Nature (Lond.)* **183**, 764—765 (1959a).
- Epithelial organization and histogenesis of the epiphysial complex in lizards. *Acta anat. (Basel)* **37**, 310—335 (1959b).
- Observations on the ultrastructure of the pineal eye. *J. roy. micr. Soc.* **79**, 47—58 (1960).
- TROST, E.: Die Histogenese und Histologie des Parietalauges von *Anguis fragilis* und *Chalcides ocellatus*. *Z. Zellforsch.* **38**, 185—217 (1953).
- WALLS, G. L.: The photo-mechanical changes in the retina of mammals. *Science* **67**, 655—656 (1928).
- The vertebrate eye and its adaptive radiation. Bloomfield Hills, Michigan: Cranbrook Institute of Science 1942.
- WISLOCKI, G. B., and R. L. SIDMAN: The chemical morphology of the retina. *J. comp. Neurol.* **101**, 53—99 (1954).
- YAMADA, E.: The fine structure of the paraboloid in the turtle retina as revealed by electron microscopy. *Anat. Rec.* **137**, 172 (1960).

Dr. RICHARD M. EAKIN, Department of Zoology, University of California,  
Berkeley (California) U.S.A.



Aus dem Anatomischen Institut der Medizinischen Akademie Kyoto  
(Direktor: Prof. Dr. H. NODA)

## ÜBER EIN BLUTBILDENDES ORGAN IN DER SELLA TURCICA DES RIESENSALAMANDERS (*MEGALOBATRACHUS JAPONICUS*)

Von

Y. SANO und CH. IMAI

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Oktober 1960)

Während sich die Hämatopoese (Erythropoese und Granulopoese) bei den höheren Wirbeltieren im wesentlichen im Knochenmark abspielt, ist die hämatopoetische Funktion bei den Fischen in die Milz, Niere und Submukosa des Verdauungstraktes verlagert. Die Arten der Blutbildung bei den Urodelen stimmen mit denen der Fische überein. Nur ALDER und HUBER (1923) sowie SCHÄFER (1935) haben blutbildendes Gewebe bei Plethodontidea (Salamandroidea) im Knochenmark beobachtet. Bei den niederen Wirbeltieren sind die erythrogranulopoetischen Gewebe nicht wie bei den Vögeln und Säugetieren von den lymphopoetischen Geweben getrennt; sie stellen also ein „gemischtes Organ“ dar. Nur die Urodelen bilden insofern eine Ausnahme, als erythropoetisches und lympho-granulopoetisches Gewebe nicht „gemischt“, sondern voneinander geschieden sind.

„Meningeales lymphoides bzw. lymphomyeloides Gewebe“ wurde von LEYDIG (1857), WALDSCHMIDT (1887), DRZEWINA (1905) u. a., und ferner SCHARER (1944) an der Dorsalfläche des IV. Ventrikels von Ganoiden beschrieben (ältere Literatur bei SCHALTENBRAND 1955). Bei anderen Wirbeltieren ist es an dieser Stelle bisher noch nicht gefunden worden. Über das Vorkommen phagozytischer, zahlreiche Einschlüsse enthaltende Meningocyten an der Oberfläche der Arachnoiden von *Bufo* berichtet PALAY (1944).

In der vorliegenden Untersuchung soll über das Vorkommen einer lympho-granulopoetischen Gewebsinsel in der Sella turcica des japanischen Riesensalamanders berichtet werden. Außerdem wird ein Vergleich mit dem „lymphomyeloiden Gewebe“ bei Ganoiden versucht.

### Material und Methode

Die Gehirne von 15 Riesensalamandern (*Megalobatrachus japonicus*) beiderlei Geschlechts (Gewicht 90—1050 g, Körperlänge 25—61 cm) wurden histologisch untersucht. Nach Dekapitation wurden Gehirn und Hypophyse exstirpiert, dann in Susa, Formol (1:9), Bouinschem, Carnoyischem oder Bодianschem II-Gemisch fixiert.

In 5 Fällen wurden die Gehirne mit der Schädelbasis in Formol fixiert, mit 5% Salpetersäure entkalkt, anschließend mit 5% Natriumsulfat behandelt. Einbettung: Paraffin und Celloidin. Frontal- und Sagittalschnittserien (Schnittdicke: Paraffin 7—8  $\mu$ , Celloidin 25  $\mu$ ). Färbungen: Aldehyd-Fuchsin (GOMORI), Azan (M. HEIDENHAIN), Hämalaun-Eosin, Gitterfaserimprägnation (BIELSCHOWSKY-SANO) und Kupfer-Protargolmethode (BODIAN-ZIESMER).

### Befunde

Der Boden des Zwischenhirns ist beim Riesensalamander durch eine dünne flache Brücke — das Infundibulum — mit dem zapfenförmigen Hinterlappen

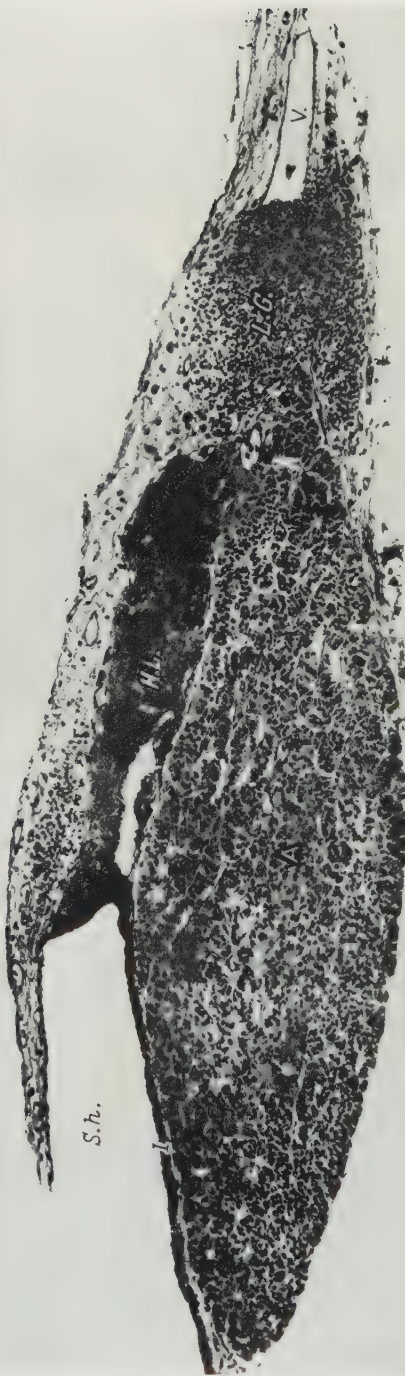


Abb. 1. Medianer Sagittalschnitt durch die Hypophyse. *A* Adenohypophyse, *H.* *L.* Hinterlappen, *I* Infundibulum, *L. G.* lymphogranulopoetisches Gewebe, *S. h.* Saccus hypophysicus, *V.* Vene (Fixierung: Bouinsches Gemisch, Färbung: Chromhämatoxylin-Phloxin, Vergr. 58fach)

verknüpft. Die mächtig ausgebildete Adenohypophyse liegt nicht nur breitbasig der Neurohypophyse auf, sondern erreicht auch noch mit ihrem kranialen Pol das untere Drittel des Hypophysenstiels. Die Hypophyse liegt in der flachen Sella turcica, von deren Wandung sie durch ein meningeales Bindegewebsseptum getrennt ist. Dorsal umgreift ein merkwürdiges Gewebsareal wie ein zweiter akzessorischer Hinterlappen die Hypophyse, das sich von den kräftig tingierten Vorderlappenzellen deutlich abhebt (Abb. 1). Die Zelldichte fällt in diesem Gewebekomplex besonders kaudal auf, während sie rostralwärts abnimmt. Meistens zeichnet sich der kraniale Pol wieder durch eine zunehmende Zellverdichtung aus. Häufig findet man am kaudalen Pol, der der Kaudalkante der Hypophyse aufsitzt, weite venöse Sinus. Ausmaß und Gestalt der dorsalen Gewebsschicht, die ausnahmslos bei allen 15 Tieren ausgebildet war, unterliegen großen individuellen Schwankungen. An seiner Dorsalfläche wird der in Rede stehende Komplex von einer dünnen Bindegewebsmembran umhüllt, die an der Basalfläche in das Duraseptum einstrahlt. Eine Verbindung dieses Gewebes mit den knöchernen Anteilen der Schädelbasis besteht an keiner Stelle. Auf Azanpräparaten erkennt man, daß sich zwischen den freien Zellen des Gewebes ein engmaschiges Fasernetz

ausspannt (Abb. 2). Noch deutlicher bringt die Gitterfaserimprägnation ein dichtes Netz argyrophiler Fasern mit unregelmäßig großen Maschen zum Vorschein



(Abb. 3). Diese Retikulumfasern sind einerseits an den Gefäßwänden, andererseits an dem Bindegewebsseptum verankert. In Begleitung der Gitterfasern trifft man verschiedentlich polymorph gestaltete Retikulumzellen an. Trabekel, die

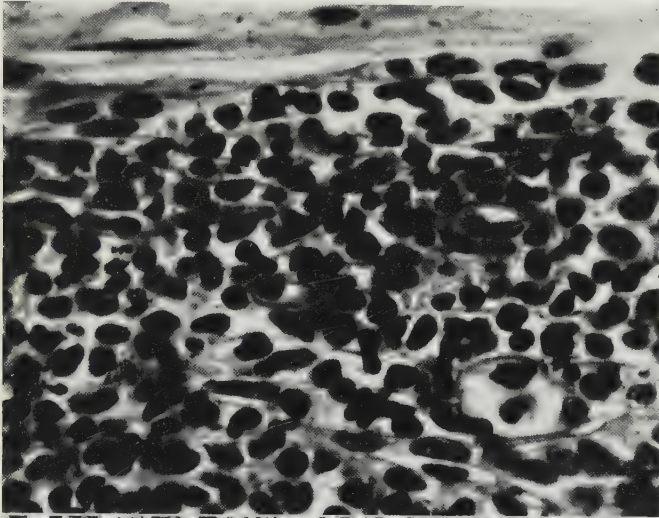


Abb. 2

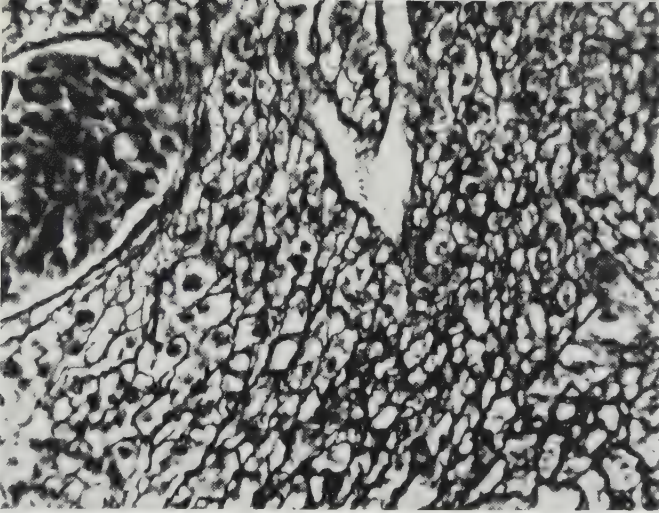


Abb. 3

Abb. 2. Von Zellen verschiedener Art durchsetztes faserig-zelliges Retikulum (Susa, Chromhämatoxylin-Phloxin, Vergr. 410fach)

Abb. 3. Silberimprägnation des Gitterfasergerüsts im lymphogranulopoetischen Gewebe (Carnoysches Gemisch, Imprägnation nach BIELSCHOWSKY-SANO, Vergr. 240fach)

vom Bindegewebsseptum in das Gewebe vordringen, fehlen. Statt dessen finden sich viele elastische Fasern, die von den Wänden großkalibrierter Gefäße abgehen und sich am Aufbau des Stroma in diesem Gewebe beteiligen (Abb. 4). Gefäße kommen in nicht großer Zahl vor. Bei den Blutgefäßen handelt es sich vorwiegend um dünnwandige Arterien und Venen, sowie um sinusartige Kapillaren mit weitem Lumen (Abb. 5).

Die am Aufbau dieses Gewebskomplexes beteiligten Zellen lassen sich nach dem Verhalten der Zellkerne, der Struktur des Zytoplasmas und der spezifischen Färbbarkeit seiner Einschlüsse in folgende Gruppen gliedern:

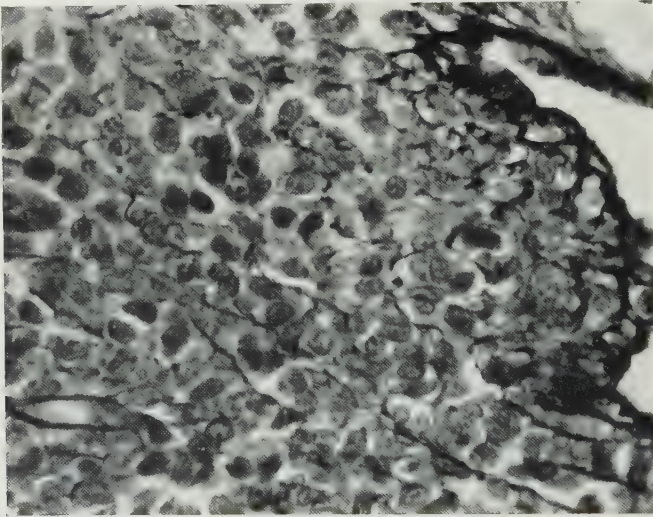


Abb. 4. Mit der Venenwand (rechts) zusammenhängendes elastisches Fasernetz (Bouinsches Gemisch, Aldehyd-Fuchsin-Kernechtrot, Vergr. 410fach)

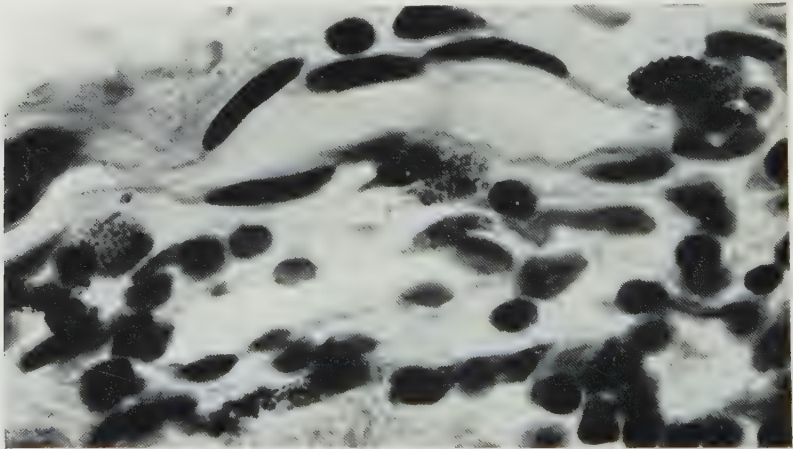


Abb. 5. Längsschnitt der mit weiten Lichtungen ausgestatteten venösen Sinusoide (Zenkersches Gemisch, Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN, Vergr. 630fach)

1. Chromatophoren (Abb. 6). Im ungefärbten Präparat finden sich Zellen, die reichlich braunes oder schwarzbraunes Pigment enthalten. Diese Pigmentzellen (Durchmesser etwa  $25-30\mu$ ), sind meist kugelige oder längliche Elemente mit kreisrundem Kern, der eine typische Radspeichenstruktur zeigt. Nur selten sind lappige oder gezackt verzweigte Ausläufer der Pigmentzellen zu sehen. Da die Chromatophoren auf verschiedene exo- oder endogene Faktoren mit Verkürzung ihrer Zellausläufer oder Verlagerung der Pigmentkörnchen im Zytoplasma empfindlich reagieren, kann über die Gestalt der Zellen nichts Sicheres ausgesagt

werden. Die staubförmigen bis körnigen Pigmentgranula im Zytoplasma dürften Melaninkörnchen darstellen. Die Oxydation (Kaliumpermanganat-Schwefelsäure) mit anschließender Reduktion (Oxalsäure oder Natriumbisulfit) entfärbt das

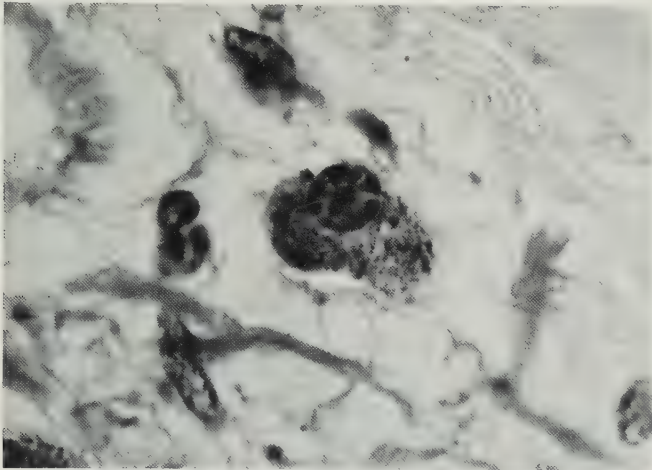


Abb. 6. Melaninkörnchen enthaltende Chromatophore (Susa, Azan, Vergr. 750fach)

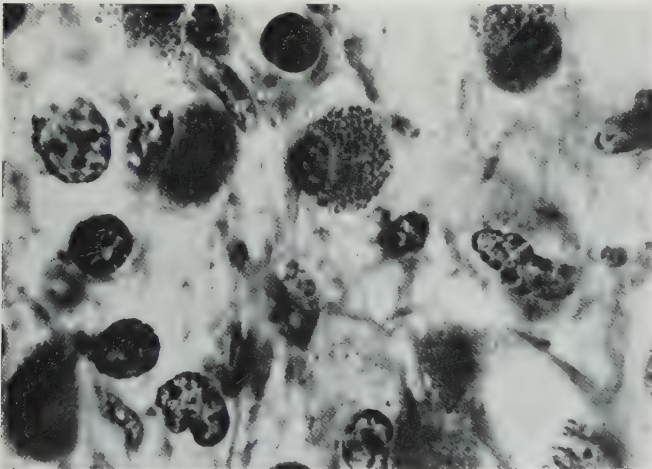


Abb. 7. Eosinophile Myelozyten (Susa, Chromhämatoxylin-Phloxin, Vergr. 750fach)

Pigment, das sich nach diesem Eingriff nur noch mit Aldehyd-Fuchsin violett-rot aber nicht mehr mit Nilblau anfärben läßt. Zellgröße, Zellform und Farbeigenschaften des Pigments dieser Zellen stimmen mit denen der Pigmentzellen in der Leptomeninx überein, was dafür zu sprechen scheint, daß das die Hypophyse umhüllende Bindegewebe aus dem meningealen Bindegewebe entstammt.

2. Fettzellen. Sie treten nur selten auf. Möglicherweise ist dafür die Ernährung verantwortlich, unter der die Tiere längere Zeit in engen Behältern gehalten werden mußten.



3. Granulozyten. Diese Zellen zeichnen sich durch spezifisch färbbare Granula im Zytoplasma aus. Am häufigsten sind Zellelemente, deren Zytoplasma grobe lichtbrechende Granula von kugeliger Form enthält, die sich mit Phloxin,

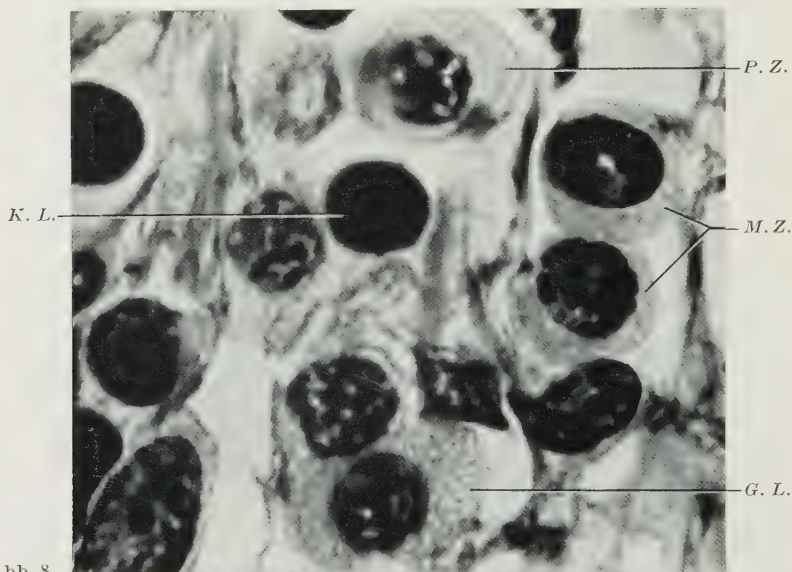


Abb. 8

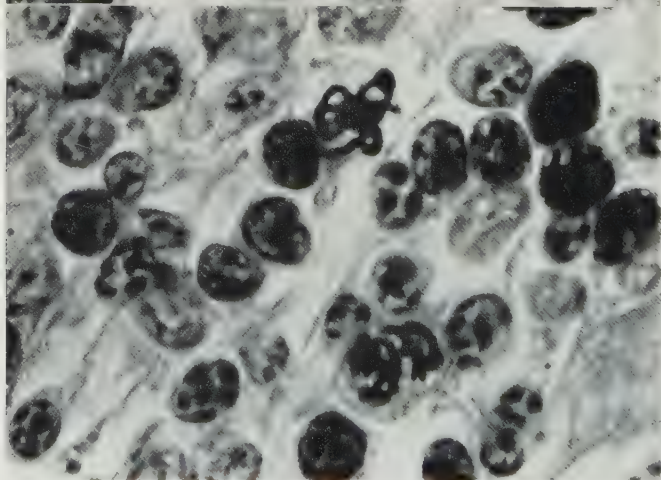


Abb. 9

Abb. 8. Verschieden große nichtgranulierte Zellen. *G. L.* großer Lymphozyt, *K. L.* kleiner Lymphozyt, *M. Z.* Myelozyten, *P. Z.* Plasmazellen (Susa, Azan, Vergr. 1200fach)

Abb. 9. Mitosen von Myelozyten (Zenkersches Gemisch, Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN, Vergr. 710fach)

Eosin und Azocarmin elektiv tingieren lassen. Diese Elemente, die mit einem Durchmesser von 15—20  $\mu$  größer als die übrigen Granulozyten sind, haben meist kugelige oder ovoide Gestalt (Abb. 7). Ihr verhältnismäßig großer, unregelmäßig gestalteter Zellkern, der in der Regel exzentrisch liegt, wird zuweilen von zahlreichen Granula weitgehend verdeckt. Auf Grund dieser Eigenschaften neigen wir dazu, diese Elemente den eosinophilen Leukocyten bzw. Myelozyten bei

Säugern zu vergleichen. Gelegentlich beobachtet man noch eine andere Zellart, deren Zytoplasma von feinkörnigen Granula übersät ist, die sich mit Hämatoxylin, besonders mit Chromalaunhämatoxylin, hervorheben lassen. Indessen

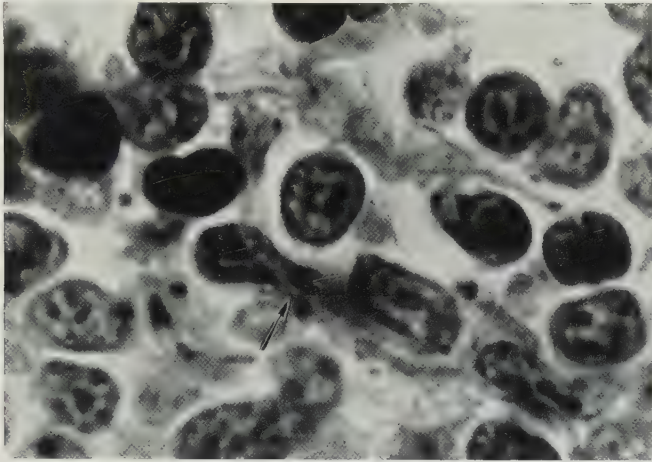


Abb. 10. Übertritt einer nichtgranulierten Zelle in das Gefäßlumen ( $\uparrow$ ) (Bouinsches Gemisch, Hämalaun-Eosin, Vergr. 710fach)

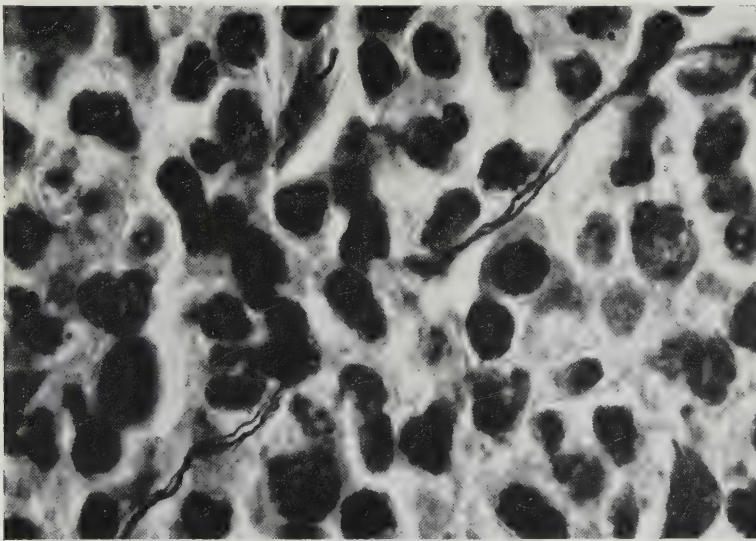


Abb. 11. Nervenfasern im meningealen blutbildenden Gewebe (Formol-Eisessig-Alkohol, Imprägnation nach BODIAN-ZIESMER, Vergr. 710fach)

kommen diese den neutrophilen Granulozyten und Myelozyten entsprechenden Zellen mit einem Durchmesser von  $10-15\mu$  nur selten vor.

4. Agranulozyten (Abb. 8). Diese Zellen haben als klein- und großzellige Elemente den größten Anteil am Aufbau des lymphogranulopoetischen Gewebes. Da die färberischen Eigenheiten dieser Zellarten sich nur im Ausstrichpräparat differenzieren lassen, sei lediglich eine grobe Zelleinteilung versucht.

Die sehr häufig auftretenden kleinen Elemente (Durchmesser etwa  $10\ \mu$ ) mit einem dichten chromatinreichen Zellkern und einem basischen Zytoplasmasaum kann man als kleine Lymphozyten ansprechen. Ihnen ähneln Zellen gleicher Größe mit einem deutlich chromatinärmeren Kern, aber noch hellerem Zytoplasma. Da man diese Elemente häufig in mitotischer Teilung antrifft, kann man sie als unreife Zellen ansehen, die den Myeloblasten und Myelozyten vergleichbar sein dürften (Abb. 9). Jedoch bleibt offen, welche dieser Zellen sich zu eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten differenzieren. Daneben erkennt man ebenso häufig größere, zytoplasmareichere Zellen mit einem Durchmesser von  $20\text{--}25\ \mu$ , deren Zellkern locker strukturiert und nicht selten eingebuchtet erscheint. Wir neigen dazu, in dieser Variante Lymphozyten- und Monozytenvorstufen zu sehen. Plasmazellen, die sich durch die Radspeichenstruktur des Zellkerns und ein reich entwickeltes Zytoplasma auszeichnen, findet man allerdings in nur geringer Zahl.

Zellformen, die auf eine Erythropoese schließen lassen, waren nicht zu beobachten.

An zahlreichen Stellen der dünnen sinusartigen Kapillarwände erscheinen hantelförmig eingeschnürte Granulozyten und Lymphozyten, die mit einem Teil ihres Zelleibes bereits in das Gefäßlumen vorgedrungen sind (Abb. 10). Hier treten offenbar reife Blutzellen in die Blutbahn über.

Markhaltige Nervenfaserbündel dringen von kaudal in das lymphogranulo-poetische Gewebe ein, verlieren hier ihre Markscheide und gliedern sich schließlich in kleinere Bündel und einzelne Nervenfasern auf (Abb. 11). Sie verlaufen nicht parallel zu den Gefäßen. Bestimmte Nervenendformationen dieser Fasern lassen sich in dem zellreichen Gewebe ebensowenig erkennen wie Fasern, die aus dem Hypothalamus-Neurohypophysensystem stammen könnten.

### Erörterung der Befunde

Die Beobachtungen von LEYDIG (1857) über ein an der Blutbildung sich beteiligendes „myeloides Gewebe“ in der Endomeninx des IV. Ventrikels bei *Acipenser* wurden später von WALDENSCHMIDT (1887: *Crossopterygii, Polypterus bichir*), DRZEWINA (1905: *Acipenser*), CHANDLER (1911: *Lepisosteus*) und VAN DER HORST (1925: *Polyodon, Amia, Acipenser*) bestätigt, aber als ein „lymphoides Gewebe“ angesprochen. Die Auffassung von TILNEY (1927), der diesem Gewebe endokrine Funktionen unterlegte, wurde von VIALLI (1932) und besonders von SCHARRER (1944) revidiert. Auf Grund seiner Untersuchungen an *Amia* und *Lepisosteus* hat SCHARRER dem meningealen Gewebe über dem IV. Ventrikel eine hämatopoetische Funktion zugeschrieben. Erythrozyten, Granulozyten und Lymphozyten würden dort extravasculär gebildet und in die Blutbahn abgegeben.

Da KOLMER (1921) beim neugeborenen Hund viele Lymphozyten und Megakaryozyten im chorioidealen Bindegewebe des Seitenventrikels und des IV. Ventrikels fand, sprach er diesem Bezirke knochenmarkähnliche Eigenschaften zu. Aber bei erwachsenen Säugetieren ist eine blutbildende Leistung an dieser Stelle nie nachgewiesen worden. Bei allen früheren Arbeiten über das hämatopoetische Organ der Urodelen (MÜLLER 1889, JACKSON 1904, JOLLY 1904, DRZEWINA 1905, JORDAN und SPEIDEL 1924, MAXIMOW 1927 u. a.) ist dieser entlegene Blutbildungsort in der Endomeninx offensichtlich übersehen worden.



Das retrohypophysäre Gewebe war individuell verschieden stark entwickelt, was offenbar auf experimentelle Einflüsse (Fang, Züchtung, Fütterung, Dekapitation usw.) zurückgeführt werden kann. (Die Tiere dienten ursprünglich Untersuchungen am Hypothalamus-Hypophysensystem.)

Unsere Befunde lassen keine Zweifel daran, daß es sich bei dem hier untersuchten Gewebe mit seinen Granulozyten- und Lymphozytenvorstufen einschließlich der Mitosefiguren um eine *Blutbildungsstätte* handelt. Auffallend ist, daß sich für eine Erythropoese — die bei den höheren Wirbeltieren immer mit der Granulopoese gemeinsam abläuft — keine Anzeichen haben finden lassen. Da SCHARRER (1944) das myeloide Gewebe an verschiedenen Stellen in knöcherne Partien des Schädels eindringen sieht, ist er der Meinung, daß vergleichend anatomisch die echte myeloische Blutbildung bereits bei den Ganoiden beginne. Wir konnten jedoch nirgends solche Grenzübertritte beobachten; hier ist vielmehr das blutbildende Gewebe allseitig durch eine Bindegewebshülle von den knöchernen Anteilen der Sella turcica getrennt. Wir neigen daher nicht zu der Bezeichnung „meningeales myeloides Gewebe“, da „myeloid“ die Erythropoese impliziert, sondern wir sprechen von einem meningealen lymphogranulopoetischen Organ.

Im Knochenmark von Vögeln und Säugetieren haben DE CASTRO (1930), ROSSI (1932), TAKEYAMA (1936, 1937), STÖHR (1957) u. a. Nervenfasern nachgewiesen. FEDOROFF, TARENTYEW, GARFUNKEL, TSESARSKAYA und ROZANOWA (1952) fanden zwischen innerviertem und denerviertem Knochenmark große Unterschiede. SCHARRER (1944) beobachtet im myeloiden Meninxorgan zahlreiche Nervenfasern, bei *Amia* sogar Nervenzellen. Wir konnten ebenfalls Bündel markloser Nervenfasern darstellen, die aber bis in ihre letzten Aufzweigungen nicht mehr zu verfolgen waren. Eine Steuerung der Blutbildung durch nervöse Faktoren in diesem Organ ist anzunehmen.

### Zusammenfassung

Histologische Untersuchungen an der Hypophyse von *Megalobatrachus japonicus* ergaben:

1. In der Sella turcica liegt dorsal von der Hypophyse ein Gewebskomplex mit knochenmarkähnlichen Zellen. Es lassen sich sowohl Vorstufen und viele Formen von verschiedenen Granulozyten und Lymphozyten ausmachen, ferner Zellen, die sich mitotisch teilen. Die Diapedese von reifen Blutzellen durch die Wandung sinusartiger Kapillaren ist zu beobachten.

2. Das Stroma dieses Gewebes wird von argyrophilem Bindegewebe mit Reticulumzellen gebildet, das sich zwischen den Blutgefäßen ausspannt. Außerdem finden sich elastische Fasern und Bündel markloser Nervenfasern.

3. Dieses Gewebe wird mit dem myeloiden Meninxorgan über dem IV. Ventrikel bei Ganoiden vergleichend betrachtet, von dem es sich dadurch unterscheidet, daß es weder erythropoetische Funktion besitzt, noch in Verbindung zum Schädelskelet steht.

### Literatur

- ALDER, A., u. E. HUBER: Untersuchungen über Blutzellen und Zellbildung bei Amphibien und Reptilien. *Folia haemat.* **29**, 1 (1923). Zit. nach MAXIMOW.  
 CASTRO, F. DE: Quelques observations sur l'intervention du système nerveux autonome dans l'ossification. Innervation du tissu osseux et de la moelle osseuse. *Trav. Labor. Rech. biol. Univ. Madrid* **26**, 215—244 (1929/30).

- CHANDLER, A. C.: On a lymphoid structure lying over the myelencephalon of *Lepidosteus*. Univ. Calif. Publ. Zool. **9**, 85—104 (1911).
- DRZEWINA, A.: Contribution à l'étude du tissue lymphoïde des ichthyopsides. Arch. Zool. exp. gén., IV. s. **3**, 145—338 (1905).
- FEDOROFF, N. A., E. I. TERENTYEV, M. L. GARTUNKEL, T. P. TSESARSKAYA and N. S. ROZANOVA: The bone marrow after damage to the sacral plexus and the sympathetic innervation. Arch. Pat. (Moskau) **14**, 25—34 (1952).
- HOLST, C. J. v. DER: The myelencephalic gland of *Polyodon*, *Acipenser* and *Amia*. Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **28**, 432—442 (1925).
- JACKSON, C.: Zur Histologie und Histogenese des Knochenmarkes. Arch. Anat. u. Physiol., Anat. Abt. **33** (1904). Zit. nach MAXIMOW.
- JORDAN, H., and C. SPEIDEL: Studies on lymphocytes. III. Granulocytopoiesis in the salamander, with special reference to the monophyletic theory of blood-cell origin. Amer. J. Anat. **33**, 485—505 (1924).
- KOLMER, W.: Über eine eigenartige Beziehung von Wanderzellen zu den Chorioidealplexus des Gehirns der Wirbeltiere. Anat. Anz. **54**, 15—19 (1921).
- LEYDIG, F.: Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere. Frankfurt a. M.: Meidinger Sohn & Co. 1857.
- MAXIMOW, A.: Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgg. von W. v. MÖLLENDORFF. Bd. II/1: Die Gewebe, Teil I. Berlin: Springer 1927.
- MÜLLER, H.: Zur Frage der Blutbildung. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. III **98**, 219 (1889). Zit. nach MAXIMOW.
- PALAY, S. L.: The histology of the meninges of the toad (*Bufo*). Anat. Rec. **88**, 257—270 (1944).
- ROSSI, F.: L'innervazione del midollo osseo. Arch. ital. Anat. Embriol. **29**, 539—559 (1932).
- SCHAEFER, K.: Blutbildendes Knochenmark bei Urodelen. Z. mikr.-anat. Forsch. **38**, 294—317 (1935).
- SCHALTENBRAND, G.: Plexus und Meningen. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgg. von W. BARGMANN, Bd. IV/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- SCHARER, E.: The histology of the meningeal myeloid tissue in the ganoids *Amia* and *Lepisosteus*. Anat. Rec. **88**, 291—310 (1944).
- STÖHR jr., PH.: Mikroskopische Anatomie des vegetativen Nervensystems. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgg. von W. BARGMANN. Ergänzung zu Bd. IV/1, Teil 5. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- TAKEYAMA, K.: Morphologische Beobachtungen über die sich im Knochenmark verteilenden peripheren Nerven. Mitt. med. Akad. Kioto **16**, 895—909, 1081—1083 (1936).
- Über die Nerven des Knochenmarks. Jap. J. med. Sci. **6**, 156—157 (1937) Abstr.
- TILNEY, F.: A glandular outgrowth from the roof of the oblongata in *Amia calva*. J. comp. Neurol. **43**, 433—449 (1927).
- VIALI, M.: L'organo linfomieloide mielencefalico dei ganoidi. Archives de Biol. **43**, 1—28 (1932).
- WALDSCHMIDT, J.: Beitrag zur Anatomie des Zentralnervensystems und des Geruchsorgans von *Polypterus bichir*. Anat. Anz. **2**, 308—322 (1887).

Prof. Dr. Y. SANO, Anatomisches Institut der Medizinischen Akademie Kyoto,  
Kyoto Kawaramachi-Hirokoji (Japan)

Institut d' Histologie et d'Embryologie — Ecole de médecine — Genève (Suisse)

## RÉGÉNÉRATION DES ÎLOTS DE LANGERHANS, AU COURS DE LA CORRECTION DU DIABÈTE EXPÉRIMENTAL DU RAT PAR BRÉPHOPLASTIE\* PANCRÉATIQUE

Par

A. M. DuBOIS et A. GONET

Avec 6 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 4 Novembre 1960)

La correction du diabète expérimental chez le rat, par la greffe de pancréas foetal a été étudiée dans d'autres travaux (DuBOIS et GONET 1960, GONET 1961). Nous ne décrivons ici, que les effets de la bréphoplastie pancréatique sur la régénération des îlots de Langerhans de l'hôte.

Nous avons provoqué un diabète expérimental sévère, chez des rats mâles albinos (souche BIEL-BENKEN), selon deux techniques: injection intrapéritonéale d'alloxane et pancréatectomie subtotale. 57 rats de 2 à 4 mois — poids 150 à 360 gr —, ont reçu, en une seule injection intrapéritonéale, une dose de 100 à 250 mg/kg d'alloxane, suivant le poids de l'animal (monohydrate d'alloxane Hoffmann-La Roche, à la concentration de 5%). D'autre part, 14 rats mâles, de même souche et de même âge, ont été pancréatectomisés. Il faut signaler que, chez le rat, il est pratiquement impossible de réaliser une pancréatectomie totale; le pancréas en forme de grappe aplatie, légèrement rosâtre, extrêmement découpée, entremêlée de tissu adipeux s'insinue dans le mésogastre dorsal sous la rate, sous la grande courbure de l'estomac et occupe tout le cadre du mésentère duodénal. Le canal de Wirsung débouche, à angle droit, dans le canal biliaire à 3—4 mm en amont du point de pénétration de ce dernier dans la paroi duodénale. Dans la région de la confluence des deux canaux, il existe toujours de petits lobules d'acini pancréatiques qu'il est pratiquement impossible de supprimer sans léser le canal biliaire. La pancréatectomie a donc toujours été subtotale et c'est à partir de ces acini demeurés sur place et du moignon du canal de Wirsung que se sont développés les régénérats pancréatiques.

L'alloxanisation et la pancréatectomie déclenchent, en 24 à 48 heures, une très forte hyperglycémie, accompagnée de glycosurie et de cétonurie, qui entraîne la mort de l'animal à bref délai; le diabète peut être maintenu dans des limites compatibles avec la survie par des injections d'insuline (GONET 1961).

Nous avons corrigé ce diabète par greffe intratesticulaire de pancréas de foetus de rat de 19 jours ou de raton nouveau-né, âgé de moins de 6 heures. Chez le rat, W. L. HARD (1944) a montré que, les premières cellules B apparaissent très tardivement, vers le 15—16<sup>e</sup> jour de la vie foetale, et qu'il faut attendre le 19<sup>e</sup> jour pour que ces cellules renferment des granulations  $\beta$ , signe de leur activité insulinaire. Quant aux premières cellules A, elles ne se différencient que 16 à 18 heures après la naissance. En greffant des pancréas foetaux du 19<sup>e</sup> jour ou de rats nouveau-nés âgés de moins de 6 heures, nous avons donc implanté, chez l'hôte, des îlots

\* Bréphoplastie = greffe d'organe foetal; terme créé par R. M. MAY.



constitués uniquement par des cellules B et le pancréas exocrine. Ce dernier est rapidement détruit par pycnose, sans avoir eu le temps de produire des cellules A; l'histologie des greffons a en effet montré qu'ils sont formés exclusivement de cellules B. La brépohplastie pancréatique provoque une chute spectaculaire de la glycémie qui, en 24 heures déjà chez les rats alloxanisés, 3—6 jours chez les pancréatectomisés, a repris son taux normal; celui-ci se maintient, dès lors, jusqu'au sacrifice de l'animal (GONET 1961). Chez les rats alloxanisés, nous avons pratiqué deux types de greffes: la greffe précoce, 24 ou 48 heures après l'injection d'alloxane et la greffe retardée où la brépohplastie n'a été faite que 6—15 jours après l'injection d'alloxane, la survie de l'animal étant assurée, pendant cette période, par des injections quotidiennes ou biquotidiennes d'insuline. Chez les rats pancréatectomisés, le diabète étant toujours moins sévère, la brépohplastie pancréatique a été pratiquée entre le 2—6<sup>e</sup> jour suivant la pancréatectomie, sans traitement à l'insuline. Les rats greffés ont été sacrifiés après un laps de temps variable s'échelonnant de 48 heures après la greffe, jusqu'à six mois. Il faut noter que les animaux pancréatectomisés ont présenté pendant les premières semaines, des troubles digestifs inhérents au manque de ferments pancréatiques: diarrhée, mal absorption des graisses et des protides (GONET et DuBOIS 1959) qui se corrigeaient par la suite. En bref, la brépohplastie pancréatique a complètement corrigé le diabète expérimental.

L'étude histologique des greffons montre que la portion endocrine prolifère activement en donnant des amas de cellules B à granulations  $\beta$  nettes et sécrétant de l'insuline (GONET 1961). Dans le cas le plus favorable, rat N° 4 sacrifié le 29<sup>e</sup> jour, les cellules endocrines formaient une masse de 3 mm de diamètre. Par la suite, les greffons involuent rapidement et, au cours du 2<sup>e</sup> mois, on ne retrouve, au lieu de la greffe, que du tissu de granulation avec quelques cellules éparses, d'aspect endocrine. Puisque la courbe de glycémie reste normale après la disparition du greffon, il faut admettre que la sécrétion d'insuline est, dès lors assumée par le pancréas de l'hôte, qu'il y a eu régénération des cellules B détruites par l'alloxane ou régénération des îlots après pancréatectomie. Sur les 14 animaux pancréatectomisés, 2 sont morts après 10 et 24 jours sans présenter de régénérat, chez les 12 restants sacrifiés 3½ ou 6 mois après la greffe, nous avons retrouvé à l'autopsie, dans le cadre duodénal, un régénérat pancréatique, formant une lame irrégulière, mince, compacte, dont le plus grand axe mesurait 10—15 mm, morphologiquement très différente du pancréas en grappe du rat normal.

Ces régénérats et le pancréas des rats alloxanisés ont été fixés au liquide de Bouin, débités à 7  $\mu$ , colorés à l'hématoxyline-éosine et par la technique de Gomori—chrome hématoxyline-érythrosine — légèrement modifiée pour l'adapter à la coloration des îlots du rat.

### Résultats histologiques

Rappelons que les îlots de Langerhans du rat adulte sont assez différents du type habituel chez les mammifères (homme, cobaye, etc. v. BARGMANN 1939, FERNER 1952). Ils sont relativement peu nombreux, de forme presque toujours ovulaire et nettement délimités; ils sont petits, le grand diamètre des plus volumineux n'excédant pas 250  $\mu$  (500—600  $\mu$  chez le cobaye) et possèdent un riche réseau capillaire. Le volume des cellules B est approximativement le double de celui des

cellules A — à l'inverse de la plupart des autres mammifères chez lesquels les cellules A sont les plus volumineuses. Les cellules B, gros polyèdres à parois nettes, renferment dans leur cytoplasme les granulations  $\beta$  vivement colorables en bleu par la chrome-hématoxyline. Ces granulations sont toujours très fines, les plus petites étant à la limite de la visibilité; leur nombre varie selon l'état physiologique de la cellule mais, même dans les cellules en activité sécrétoire, la densité des granulations n'est jamais très élevée. Les petites cellules A, au contraire, sont constamment bourrées de granulations  $\alpha$  assez grossières, vivement colorables en rouge par l'érythrosine, mais peu éosinophiles, et les limites cellulaires sont difficiles à déceler. Dans les deux types cellulaires, les noyaux sont pratiquement identiques: sphériques, assez riches en chromatine, avec 1 ou 2 nucléoles. Dans une coloration banale à l'hématoxyline-éosine, on peut cependant identifier les deux types cellulaires par leur différence de taille: dans un cordon de cellules A les noyaux sont toujours beaucoup plus rapprochés que dans une plage de cellules B. Une particularité de l'îlot de rat réside dans le fait que les cellules B sont groupées, au centre de l'îlot, les cellules A formant une couronne périphérique plus ou moins continue, de 2 ou 3 rangs d'épaisseur. Cette architecture rappelle celle des îlots à manteau, caractéristiques du pancréas foetal, chez l'homme et le cobaye. Les petits îlots, dont le diamètre est inférieur à  $40\ \mu$ , sont formés uniquement de cellules B.

Le rapport entre le nombre des cellules A et B varie selon les auteurs. Pour GROBÉTY (1944), il serait de 18% A:82% B comparable à celui établi pour l'homme et le cobaye, alors que pour HULQUIST et coll. (1949), les cellules A ne formeraient que le 5—10% de la masse des îlots; plus récemment, FERNER (1952) a établi la valeur de ce rapport à 23% A:77% B. Notons pour terminer que les cellules D sont extrêmement rares dans les îlots du rat.

### *1. Les îlots des rats alloxanisés et greffés*

Nous avons examiné les pancréas de 38 rats alloxanisés et greffés; 36 ont été sacrifiés entre le 2<sup>e</sup> et 32<sup>e</sup> jour suivant la greffe; les deux derniers après 6 mois. Sur ces 38 animaux, 30 étaient porteurs d'une greffe précoce, la bréphoplastie pancréatique ayant été effectuée 24—48 heures après l'injection d'alloxane et 8 porteurs d'une greffe retardée; chez ces derniers, le diabète avait été maintenu dans les limites compatibles avec la survie, à l'aide d'injections d'insuline pendant 10—15 jours entre l'injection d'alloxane et la bréphoblastie. L'étude des coupes a montré que le traitement préliminaire à l'insuline n'influe pas le mode de régénération ou de néogenèse des îlots. Nous ne tiendrons donc pas compte du type de la greffe dans la description qui suit.

Chez 4 animaux sacrifiés 24—48 heures après la bréphoblastie, tous les îlots présentent l'image classique de l'intoxication alloxanique; les îlots inférieurs à  $40\ \mu$  de diamètre, constitués exclusivement de cellules B sont détruits; il n'en reste que quelques noyaux pycnotiques. Dans les plus gros îlots, la partie centrale, occupée auparavant par les cordons de cellules B est réduite à quelques noyaux pycnotiques dans une masse semi-lysée renfermant un réseau capillaire désorganisé. Une ou deux cellules B ont parfois survécu à l'intoxication alloxanique mais présentent de graves altérations: noyau hypertrophié et irrégulier, cytoplasme dégranulé et vacuolisé. Les cellules A enserrant cette masse d'une bordure

épaisse et festonnée; l'îlot, rétréci par suite de la disparition des cellules B, est souvent plus ou moins décollé des acini exocrines.

A partir du 3—4<sup>e</sup> jour après la greffe et jusqu'au 14—15<sup>e</sup> (13 animaux), on assiste à une prolifération progressive et massive des cellules A en bordure des gros îlots et à la néogenèse de petits îlots formés exclusivement de cellules A, à partir des acini exocrines (les processus de néogenèse et de régénération seront décrits plus loin v. p. 486). Sur une coupe colorée au GOMORI, les îlots de toutes tailles sont rouges, les plus gros ayant au centre, une portion nécrotique plus ou moins volumineuse. Ils sont souvent très bosselés, le bourgeonnement des cellules A

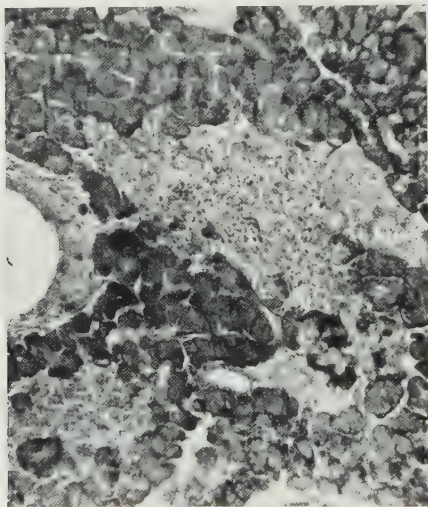


Fig. 1

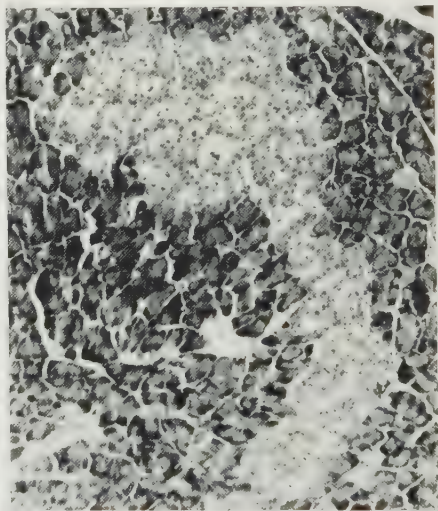


Fig. 2

Fig. 1. Rat No 6. 8 jours apr. inj. d'alloxane et 4 jours apr. brérophlastie. Gros îlot irrégulier; prolifération des cellules A, noyaux pyknotiques des cellules B. Gomori; Gross.  $\times 100$

Fig. 2. Rat No 25. Régénérat pancréatique de 3½ mois. Îlot géant de 700  $\mu$  de longueur, formé exclusivement de cellules B. Gomori; Gross.  $\times 100$

néoformées ne se faisant pas régulièrement sur toute la périphérie de l'îlot: on trouve parfois de grosses masses irrégulières de cellules A, dont le plus grand axe atteint et dépasse 500  $\mu$ , qui doivent probablement provenir de la coalescence de plusieurs îlots (Fig. 1) au cours de cette prolifération de cellules A. Comme au stade précédent, on peut trouver dans la masse centrale des gros îlots quelques cellules B dégranulées à noyaux hypertrophiés.

Dès le 14<sup>e</sup>, mais surtout à partir du 17<sup>e</sup> jour après la greffe, tandis que la prolifération des cellules A se poursuit activement, on voit réapparaître les cellules B par deux processus: néogenèse de tout petits îlots formés exclusivement de grosses cellules B, et différenciation de quelques cellules B à la périphérie des plus gros îlots. Entre le 14—32<sup>e</sup> jour (19 animaux) la prolifération des cellules A, très exubérante au début, tend à se ralentir alors que celle des cellules B augmente. La coupe d'un pancréas du 29—32<sup>e</sup> jour montre une polynésie de très petits îlots néoformés, plus ou moins irréguliers, formés de quelques grosses cellules B pauvres en granulations; les îlots de taille moyenne (50—100  $\mu$ ) sont normalement constitués par une masse de cellules B, richement vascularisée, bordée par quelques



petits placards minces de cellules A. Ces îlots sont certainement aussi des îlots néoformés à un stade plus avancé de leur évolution. Enfin les plus gros îlots ont repris une forme à peu près ovalaire mais leur architecture est souvent atypique; les cellules B, trop peu nombreuses, sont intriquées parmi les gros cordons de cellules A qui occupent encore la plus grande partie de l'îlot.

La courbe de glycémie étant normalisée depuis longtemps, nous n'avons pas conservé des rats alloxanisés et greffés au delà du 32<sup>e</sup> jour, à l'exception de 2 individus sacrifiés au bout de 6 mois. Chez ceux-ci, l'architecture insulaire est redevenue normale. Certains îlots présentent parfois à leur périphérie quelques signes d'activité; un ou deux acini en voie de transformation endocrine. Mais c'est un processus que l'on constate également dans le pancréas des rats témoins.

## 2. Les régénérats pancréatiques

Les régénérats pancréatiques des 10 rats pancréatectomisés, sacrifiés 3½ mois après la greffe, ont une structure identique. La portion exocrine est formée de petits acini, extrêmement serrés: la disposition en lobules est souvent peu nette et le tissu adipeux interlobulaire fait presque constamment défaut. On trouve toujours, dans la série des coupes, les sections du canal de Wirsung et celle de 2 ou 3 petits ganglions lymphatiques habituellement situés au confluent des canaux biliaire et de Wirsung, preuve que le régénérat a bien eu, pour point de départ, la région du pancréas entourant la portion distale du canal de Wirsung; de nombreux canaux collecteurs débouchent de tous côtés dans la lumière de celui-ci. Signalons encore que dans les acini exocrines, les cellules centroacineuses sont rares, et les cellules acineuses, riches en granulations de zymogène, ont fréquemment des noyaux hypertrophiés ou sont binucléées.

La glande endocrine est constituée par de nombreux îlots de taille et de forme extrêmement variables. Les plus volumineux constituent des masses irrégulières, à contours souvent mal définis, dont le plus grand axe peut dépasser 700  $\mu$  (Fig. 2); ils résultent vraisemblablement de la coalescence de plusieurs îlots néoformés à proche distance les uns des autres. À côté de ces gros amas insulaires, on trouve des îlots de toutes tailles, les plus petits formés de quelques cellules seulement. Cette polynésie endocrine donne aux régénérats pancréatiques une apparence qui les différencie totalement du pancréas normal de rat, dont nous avons signalé plus haut la pauvreté en îlots.

Du point de vue de leur structure histologique, les îlots des régénérats offrent un caractère très particulier; ils sont formés presque exclusivement de cellules B. Colorés à la chrome-hématoxyline-érythrosine, tous les îlots sont bleus, la couronne de cellules A rouge manque totalement. Toutefois, en étudiant systématiquement les plus gros îlots, on finit par découvrir à leur périphérie quelques cellules A isolées ou en plaques formées de 4 à 5 cellules, sur un seul rang d'épaisseur et pauvres en granulations  $\alpha$ . Dans les trois régénérats des rats pancréatectomisés et sacrifiés après 6 mois, certains îlots sont encore volumineux, mais les cellules A périphériques sont plus nombreuses. Dans ces îlots de régénérat, le rapport A:B est donc complètement modifié, le nombre de cellules A étant toujours très inférieur à la normale.

En ce qui concerne les cellules B, elles sont morphologiquement identiques à celles des îlots chez le rat normal. Nous avons retrouvé le fait signalé par

HUGHES (1947): dans les petits îlots dont le diamètre est inférieur à  $50\ \mu$ , les cellules B sont un peu plus volumineuses et moins riches en granulations que dans les gros îlots, caractéristiques, d'après cet auteur, des cellules B jeunes. Nous n'avons jamais observé de cellules endocrines en mitose.

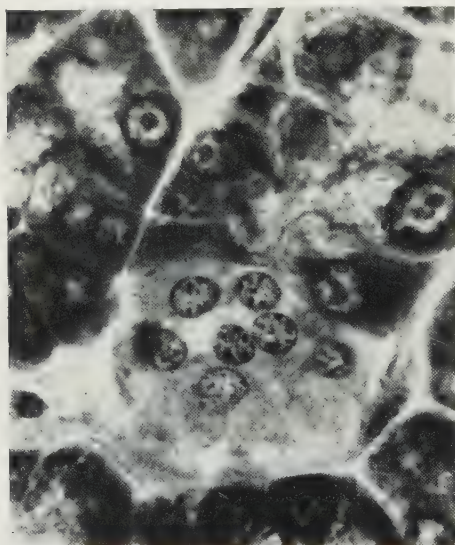


Fig. 3

Fig. 3. Rat No 59. 8 jours apr. inj. d'alloxane et 10 jours apr. brépheplastie. Néogenèse d'un îlot de cellules A. Gomori; Gross.  $\times 1000$

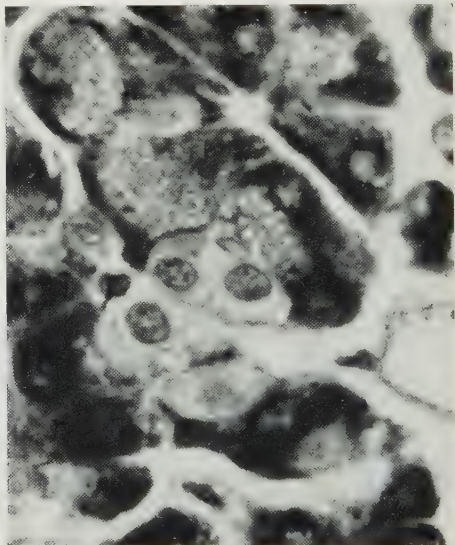


Fig. 4

Fig. 4. Rat No 23. Régénérat pancréatique de  $3\frac{1}{2}$  mois. Néogenèse d'un îlot de cellules B aux dépens de deux acini voisins. Gomori; Gross.  $\times 1000$

### 3. Régénération et néogenèse des îlots

Dans le pancréas des rats alloxanisés, comme dans les régénérats après pancréatectomie, les processus qui assurent la régénération et la néogenèse des îlots sont identiques. Dans la majorité des cas, les cellules insulaires A et B dérivent des cellules acineuses par dédifférenciation puis prolifération de ces dernières; beaucoup plus rarement, ce sont les cellules épithéliales de la paroi des petits canaux collecteurs qui leur donnent naissance. Cette formation des cellules endocrines à partir du tissu exocrine a déjà été décrite dans le diabète expérimental, chez différentes espèces de mammifères (GROBÉTY 1947, CREUTZFELDT 1950, FERNER 1952, FALLER 1955, DuBois 1957); chez l'animal normal, elle assure constamment l'accroissement et la néogenèse des îlots après la naissance et même encore dans l'âge adulte. Les cellules acineuses qui vont fournir des éléments endocrines A ou B, perdent leurs granulations apicales de zymogène et leur réserve basale de RNA; dans le cytoplasme éclairci, apparaissent des granulations  $\alpha$  ou  $\beta$  pendant que le noyau se multiplie rapidement — par amitose vraisemblablement, car nous n'avons jamais trouvé de figures mitotiques — et ces nouveaux noyaux acquièrent immédiatement la structure de noyaux de cellules endocrines. Il se forme de gros bourgeons plasmodiaux, A ou B suivant les cas (Fig. 5) et même parfois mixtes, une ou deux grosses cellules B prolongeant un amas plasmodial A. On

trouve ainsi, en bordure des îlots en régénération, des acini éventrés dont la portion tangente à l'îlot n'est plus qu'une masse plus ou moins volumineuse de bourgeons plasmodiaux endocriniens, qui s'appliquent sur le tissu insulaire déjà existant tandis que la partie distale de l'acinus est encore formée de cellules

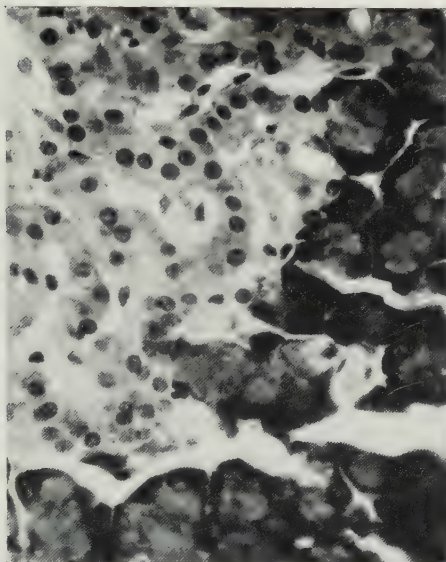


Fig. 5

Fig. 5. Rat No 22. Régénérat pancréatique de 3½ mois. Prolifération de cordons plasmodiaux B à partir des acini en bordure d'un îlot. Gomori; Gross. x 400

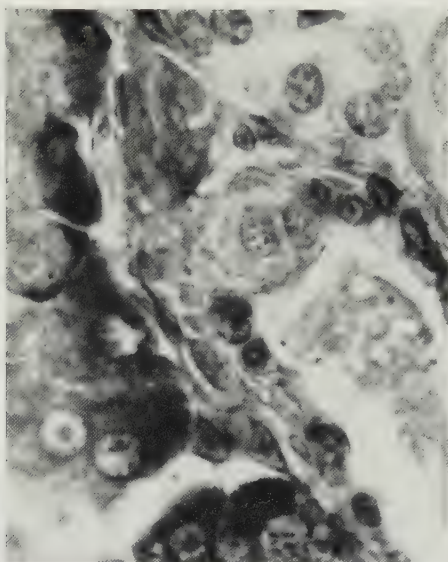


Fig. 6

Fig. 6. Rat No 22. Régénérat pancréatique de 3½ mois. Différenciation de deux cellules B dans l'épithélium d'un canalicule. Gomori; Gross. x 1000

exocrines typiques; Dans la partie centrale de ces acini délamnés en deux régions de structures tout à fait différentes, on rencontre parfois une cellule centro-acineuse, reconnaissable à son noyau clair, très allongé, qui ne participe pas à la différenciation endocrinienne. La néoformation de cellules endocrines chez l'adulte, à partir des cellules centro-acineuses signalées chez divers animaux (CREUTZFELDT 1950; BENCOSME 1955; FRUTEAU DE LACLOS et LOUBATIÈRES 1960), ne semble pas être réalisée chez nos rats car, dans certaines coupes où presque toutes les cellules d'un acinus sont en voie de transformation endocrinienne, on retrouve encore au centre un noyau de cellule centro-acineuse d'aspect normal.

Chez les animaux alloxanisés et greffés, la néogenèse de petits îlots formés de cellules A (Fig. 3), la prolifération des cellules A en bordure des plus gros îlots après destruction des cellules B par l'alloxane et la néoformation plus tardive des cellules B paraît se faire exclusivement à partir des cellules acineuses. Dans les régénérats pancréatiques après pancréatectomie, la prolifération massive des cellules B (Fig. 4) est assurée par le même processus, mais il s'y ajoute parfois une différenciation directe de cellules B à partir de la paroi des canalicules excréteurs les plus étroits. Une ou deux cellules de l'épithélium canaliculaire, cubique simple, à noyau ovale, s'hypertrophient (Fig. 6) en faisant hernie, par leur base, dans le conjonctif sous-jacent; des granulations  $\beta$  apparaissent dans leur cytoplasme,



le noyau s'arrondit et se multiplie. Il se forme ainsi un bourgeon de cellules B qui se détache du canal et qui est le point de départ d'un petit îlot dans le cas de la néogenèse ou qui s'applique à la surface d'un îlot déjà existant dans le voisinage. Ce mode de formation de cellules B à partir des canalicules est identique à celui qui régit normalement la différenciation des premières cellules B, dès le 16<sup>e</sup> jour de la vie foetale, il n'est pas étonnant que l'on retrouve, dans les régénérats pancréatiques, un processus analogue à celui réalisé normalement au cours de l'organogenèse. La régénération du pancréas, après pancréatectomie, débute vraisemblablement par bourgeonnement de canaux à partir de l'épithélium du moignon du canal de Wirsung, demeuré en place. Nous n'avons pas, dans notre matériel, les stades initiaux de ce processus; cependant, certaines coupes de régénérats au voisinage du canal de Wirsung sont pauvres en acini et riches en sections de canaux de diamètres variables, image inhabituelle pour un pancréas adulte mais comparable à celle d'un pancréas foetal; on peut donc supposer que la régénération suit les mêmes étapes que l'organogenèse: prolifération initiale des canaux puis différenciation des acini à l'extrémité distale des canalicules; les premiers éléments insulaires se forment d'abord aux dépens de l'épithélium canaliculaire, et par la suite à partir des acini. Les cellules A, d'apparition beaucoup plus tardive, se différencieraient toujours aux dépens des acini exocrines.

### Discussion des résultats

La transformation des cellules exocrines en bourgeons endocriniens a été souvent décrite dans le diabète expérimental, chez différentes espèces animales (GROBÉTY 1947, CREUTZFELDT 1950, FERNER 1952, FALLER 1955, HUGHES 1956, DuBois 1957). Par contre, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons constaté que sporadiquement la transformation directe de cellules des épithéliums canaliculaires en cellules B, et seulement dans les régénérats pancréatiques après pancréatectomie. Ce second mode de régénération (signalé chez le chien par CREUTZFELDT 1950) a été décrit par ABD EL WAHED et NOOZ (1956) comme le processus normal essentiel pour assurer la régénération des îlots après alloxanisation chez le rat adulte (100 mg/kg en une seule injection), au cours des 4 semaines qui suivent l'injection; pour ces auteurs, la régénération à partir des acini est secondaire. Leurs microphotographies montrent des plages de section de canaux plus ou moins oblitérés, proliférant dans le conjonctif intercanaliculaire, des bourgeons endocrines. Nous n'avons jamais trouvé dans nos coupes, de régions où les canalicules pancréatiques soient aussi nombreux et serrés. Enfin, nous n'avons pas observé le 3<sup>e</sup> mode de régénération des cellules endocrines signalé par divers auteurs (chez le chat par NOËL et COSNIER 1955, chez le chien par FRUTEAU DE LACLOS et LOUBATIÈRES 1960) à partir des cellules centro-acineuses; au contraire dans certains acini en voie de transformation endocrinienne, les noyaux des cellules centro-acineuses conservent leurs caractères morphologiques particuliers et ne semblent prendre aucune part dans les processus de régénération des cellules endocrines.

Chez les rats alloxanisés et greffés, entre le 4—5<sup>e</sup> jour et le 14<sup>e</sup> jour après la greffe, la régénération et la néogenèse des îlots produisent uniquement des cellules A. Cette prolifération massive et rapide de cellules A a été signalée par tous les auteurs, chez les rats et les autres espèces animales rendues expérimentalement

diabétiques par action de l'alloxane. A côté de son action toxique bien connue sur les cellules B, l'alloxane semble donc activer la prolifération des cellules A sans que, jusqu'ici, aucune explication satisfaisante de ce processus n'ait été donnée. La fonction diabétogène des cellules A, par sécrétion de glucagon n'a pas été démontrée d'une façon absolue. Si elle existe réellement, il faudrait admettre que la greffe pancréatique foetale produit assez d'insuline non seulement pour compenser la disparition de la fonction insulinique des îlots du pancréas de l'hôte, mais encore pour équilibrer l'augmentation de la sécrétion du glucagon, résultant de la prolifération des cellules A. A partir du 14<sup>e</sup> jour et jusqu'au 32<sup>e</sup> jour, la courbe de glycémie restant normale, on voit réapparaître progressivement des cellules B dans les îlots de l'hôte, tandis que la prolifération des A se ralentit. On peut supposer que l'activité insulinique du greffon commence très lentement à diminuer et que ce ralentissement sécrétoire de la greffe est, au fur et à mesure, compensé par la réapparition des cellules B dans le pancréas de l'hôte. Lorsque le rapport A:B est redevenu normal dans les îlots de l'hôte, le greffon a dégénéré. Dans les travaux sur le diabète alloxanique chez le rat, la réapparition des cellules B est beaucoup plus tardive que dans nos conditions expérimentales. Il faudrait rechercher l'explication de cette réapparition très précoce des cellules B, dès le 14<sup>e</sup> jour, dans une action directe du greffon sur le pancréas de l'hôte.

Pour les rats pancréatectomisés et greffés, il nous manque malheureusement les premiers stades de la régénération du pancréas; les deux animaux morts 10 et 24 jours après la greffe ne présentaient pas encore de traces de régénérats; chez les 10 rats sacrifiés 3½ mois après la greffe, les courbes de glycémie ont été normalisées dès le 5—6<sup>e</sup> jour après la bréphoplastie et, à l'autopsie, nous n'avons retrouvé dans le testicule que les derniers reliquats de la greffe. La polynésie et la macronésie, la forme souvent irrégulière des îlots et l'absence presque totale de cellules A sont les caractéristiques du tissu endocrinien dans ces régénérats. On peut vraisemblablement admettre que la différenciation du tissu endocrinien, à partir de la glande exocrine en voie de régénération est la répétition du processus normal de différenciation des îlots à partir du 16<sup>e</sup> jour de la vie foetale; la structure, la forme et la pauvreté en cellules A des îlots dans les régénérats de 3½ mois rappelle celles des îlots du raton âgé de 24 heures environ. La greffe ayant supprimé définitivement le diabète consécutif à la pancréatectomie, la sécrétion d'insuline a été jusqu'au 24<sup>e</sup> jour (et probablement plus longtemps) assurée par le greffon. Au fur et à mesure que régénère le pancréas de l'hôte, les cellules B des îlots néoformés prennent en charge la sécrétion d'insuline tandis que les cellules B du greffon régressent. Lorsque le nombre des cellules B néoformées est suffisant pour assurer l'équilibre de la glycémie, le greffon a pratiquement disparu.

### Résumé

La greffe de pancréas foetal chez le rat alloxanisé (une injection d'alloxane de 100—250 mg/kg) corrige immédiatement et définitivement le diabète. La sécrétion d'insuline est, au début, assurée par le greffon puisque dans les îlots du pancréas de l'hôte l'alloxane a provoqué la destruction totale des cellules B. Durant les deux premières semaines qui suivent la bréphoblastie, les îlots sont le lieu d'une prolifération massive de cellules A; les premières cellules B néoformées apparaissent

vers le 15<sup>e</sup> jour mais la proportion normale des cellules A:B n'est rétablie que 1½ à 2 mois après l'implantation de la greffe. Au fur et à mesure de la régénération des cellules B, la fonction insulinique des îlots du pancréas de l'hôte se substitue à celle du greffon qui dégénère progressivement.

Chez les rats pancréatectomisés et greffés, la sécrétion d'insuline est également assurée par le greffon pendant le 1<sup>er</sup> mois environ. La régénération du pancréas à partir de reliquats pancréatiques laissés dans la région de la confluence des canaux de Wirsung et biliaire, aboutit, à 3½ mois, à une polynésie d'îlots, souvent volumineux et irréguliers, formés presque exclusivement de cellules B. La glycémie restant constamment normale, la sécrétion d'insuline est ici encore dans une première phase, assumée par le greffon qui dégénère, par la suite, au fur et à mesure que les îlots du régénérat sont capables de sécréter de l'insuline en quantité suffisante pour assurer l'équilibre glycémique.

La prolifération et la néogenèse des cellules A, comme celles des cellules B, se font essentiellement aux dépens des cellules des acini exocrines qui perdent leurs caractères de cellules exocrines (disparition des granulations de zymogène et de la réserve de RNA) et prolifèrent en gros bourgeons plasmodiaux A ou B. La différenciation de cellules endocrines se fait également, mais plus rarement, à partir de l'épithélium des petits canalicules sécrétoires sous acineux.

### Bibliographie

- BARGMANN, W.: Die Langerhansschen Inseln des Pankreas. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. VI/2, S. 196—288. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1939.
- BENCOSME, S. A.: The histogenesis and cytology of the pancreas islets in the rabbit. *Amer. J. Anat.* **96**, 103—107 (1955).
- CREUTZFELDT, W.: Experimentelle Untersuchungen über die Regenerationsfähigkeit des Inselapparates. *Z. Zellforsch.* **35**, 47—61 (1950).
- DUBOIS, A. M.: L'intoxication alloxanique chez la femelle gravide de cobaye. II. Effets de l'alloxane sur les îlots endocriniens du pancréas de la mère et du fœtus. *Z. Zellforsch.* **47**, 226—244 (1957).
- , et A. GONET: Effets de la greffe de pancréas fœtal sur la glycémie et la régénération des îlots de Langerhans de rats diabétiques. *Acta anat. (Basel)* **41**, 336 (1960).
- FALLER, A.: Effet stimulant de faibles doses d'alloxane sur les cellules B des îlots pancréatiques. *Imprensa med. (Rio de J.)* **25**, 32—43 (1949).
- Les phénomènes de régénération cellulaire pancréatique dans les diabètes chroniques par l'alloxane et l'acide dialurique. *Rev. int. Hépat.* **5**, 215—222 (1955).
- FERNER, H.: Das Inselssystem des Pankreas. Stuttgart: Georg Thieme 1952.
- FRUTEAU DE LACLOS, C., et A. LOUBATIÈRES: Effets des azylsulfonamides hypoglycémisants sur la structure histologique du pancréas du chien normal ou diabétique. *C. R. Ass. Anat.* **106**, 261—278 (1960).
- GONET, A.: La correction du diabète expérimental du rat par la greffe pancréatique foetale. Thèse No 2777, Fac. de Méd. Genève 1961.
- , et A. M. DuBois: Effets des ferments pancréatiques sur les processus digestifs de rats pancréatectomisés. *Schweiz. med. Wschr.* **89**, 1365—1368 (1959).
- GROBÉTY, J.: Veränderungen des Zellbildes der Langerhansschen Inseln unter dem Einfluß von Alloxan. *Acta anat. (Basel)* **3**, 194—208 (1947).
- HARD, W. L.: The origin and differentiation of A and B cells in pancreas islets of the rat. *Amer. J. Anat.* **75**, 369—403 (1944).
- HAYAT, A., u. A. NÖÖZ: Regeneration im Pankreas der Ratte. *Z. Zellforsch.* **44**, 185—190 (1956).
- HUGHES, H.: Cyclical changes in the islets of Langerhans in the rat pancreas. *J. Anat. (Lond.)* **81**, 82—91 (1947).



- HUGHES, H.: An experimental study of regeneration in the islets of Langerhans with reference to the theory of balance. *Acta anat* (Basel) **27**, 1—61 (1956).
- HULQUIST, G. T., M. DAHLEN u. C. HELANDER: Über die Technik bei Darstellung und Zählung der sogenannte Silberzellen in den Langerhansschen Inseln. *Schweiz. Z. Path.* **11**, 570 bis 576 (1948).
- NOËL, R., et J. COSNIER: Faits observés au cours de la néo- et rétrogenèse insulaire chez le rat blanc. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **149**, 120—123 (1955).
- SEEHOLZER, A.: Beitrag zur qualitativen und quantitativen Histologie des Dialursäure-diabetes der Albinoratte. *Z. Zellforsch.* **38**, 356—373 (1953).

P. D. Dr. A. M. DuBois, Institut d'Histologie et d'Embryologie,  
Ecole de médecine, Genève (Suisse)

Institut d'Histologie et d'Embryologie Générale de l'Université de Fribourg (Suisse)  
(Directeur: Prof. GIUSEPPE CONTI)

SUR LA MORPHOLOGIE  
DES CELLULES NERVEUSES GANGLIONNAIRES SYMPATHIQUES  
AU COURS DE DIFFÉRENTES MALADIES\*

(MALADIE DE BÜRGER, MALADIE DE RAYNAUD, GELURES,  
MEGADOLICHOCOLON)

Par

GIUSEPPE CONTI

Avec 32 Figures dans le Texte

(Manuscrit reçu le 3 Novembre 1960)

Sommaire

	Page
Introduction . . . . .	492
Matériel examiné . . . . .	493
Cas de Megadolichocolon . . . . .	513
Considérations . . . . .	518
1. Considérations d'ordre technique . . . . .	518
2. Individualité dans la morphologie ganglionnaire . . . . .	523
3. Caractères généraux des modifications ganglionnaires . . . . .	527
4. Modifications ganglionnaires de nature proliférative . . . . .	528
a) Hypertrophie et hyperplasie neuronale . . . . .	528
b) Appendices à boule terminale et boutons terminaux . . . . .	530
c) Capsule pericellulaire . . . . .	532
5. Modifications ganglionnaires de nature dégénérative . . . . .	534
a) Vacuolisation . . . . .	535
b) Autres images dégénératives . . . . .	537
c) Noyau . . . . .	537
Conclusions . . . . .	538
Resumé . . . . .	541
Bibliographie . . . . .	542

Introduction

L'extirpation de ganglions nerveux de la chaîne sympathique latéro-vertébrale est pratiquée depuis un certain temps chez les patients souffrant de troubles vasculaires périphériques et aussi d'autres maladies. Sur les effets thérapeutiques de cette opération les opinions sont discordantes, mais il existe un fait bien acquis: si l'opération est exécutée au stade initial de la maladie le patient en ressent un avantage certain. L'étude des ganglions nerveux extirpés a par conséquent toujours attiré l'attention des morphologistes et des cliniciens qui se sont attachés à ce problème dans l'espoir de pouvoir éclaircir la pathogénèse, encore inconnue, de la maladie.

Les travaux dans ce domaine sont assez nombreux, mais on est frappé, à l'examen de la littérature, de constater que la morphologie des ganglions nerveux sympathiques est décrite d'une manière discordante, parfois même tout à fait

\* Ce travail a été réalisé avec l'aide d'un subside du Fonds National Suisse de la recherche scientifique.

opposée, pour la même maladie. Certains auteurs par exemple (entre autres CRAIG et KERNOHAN 1933; KUNTZ 1938; SKOOG 1946) affirment que les modifications des cellules nerveuses ganglionnaires au cours des maladies vasculaires sont insignifiantes par rapport à la norme. Pour d'autres auteurs par contre (entre autres SUNDER-PLASMANN 1938; STÖHR 1943—1950; HAGEN 1949; FEYRTTER 1950) les cellules ganglionnaires sympathiques d'individus atteints de maladies vasculaires périphériques présentent des signes évidents d'altérations morphologiques. La presque totalité de ces recherches comporte des descriptions morphologiques détaillées se référant à des cas cliniques isolés, par conséquent on ne peut pas en tirer des conclusions sur le comportement des ganglions nerveux au cours des maladies en question. Deux auteurs se sont occupés du problème de manière plus approfondie: HERZOG (1950) qui arrive à la conclusion que les modifications ganglionnaires se traduisent surtout par des images prolifératives, et ENGELBRECHT (1951) qui souligne, lui, la prédominance des phénomènes régressifs.

Ayant eu la possibilité<sup>1</sup> non seulement d'avoir à notre disposition un assez vaste matériel (52 ganglions nerveux extirpés chirurgicalement), mais aussi de suivre personnellement avant, pendant et après l'opération les patients hospitalisés, nous avons repris l'étude de la morphologie de ces ganglions. Pour chacun des 23 patients dont on a étudié les ganglions, nous avons tenu à souligner les données suivantes: l'âge du malade, la date de début de la maladie et surtout la gravité clinique de celle-ci, pour déduire éventuellement d'une manière assez précise si l'un ou l'autre de ces facteurs était en relation directe avec les altérations morphologiques observées dans les ganglions.

Des cas étudiés, 16 patients souffraient de maladie de Bürger aux membres inférieurs, 1 de la même maladie aux membres supérieurs, 3 patients étaient atteints de maladie de Raynaud aux membres supérieurs, 1 présentait au membre supérieur droit des troubles vasculaires déterminés par une compression veineuse, 1 malade était frappé aux membres inférieurs de troubles vasculaires périphériques déterminés par cause violente (congélation), enfin 1 patient était atteint de mégadolichocôlon. Tous ces cas sont décrits dans le texte, groupés par maladie; dans chaque groupe les malades sont cités en ordre progressif selon le temps depuis lequel date la maladie.

Les ganglions nerveux examinés ont été imprégnés selon les méthodes au nitrate d'argent de Cajal-de Castro et de Bielschowsky-Gros.

### Matériel examiné

*Cas 1. — C. A., 41 ans.* Le patient souffre depuis 1 mois, au membre inférieur droit, de troubles cliniques légers se rapportant à la maladie de Bürger. On a examiné 16 coupes microscopiques des ganglions sympathiques extirpés chirurgicalement (le ganglion coeliaque droit et les 2 premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire<sup>2</sup>). La morphologie de la presque totalité des cellules nerveuses

<sup>1</sup> Nous remercions vivement le Prof. V. PETTINARI, Directeur de la Clinique chirurgicale de l'Université de Padova, et le Dr. M. QUELOZ, Chef du service de chirurgie de l'Hôpital Cantonal de Fribourg, pour avoir mis avec bienveillance le matériel opératoire à notre disposition.

<sup>2</sup> Dans ce cas, comme dans les autres cas de Bürger aux membres inférieurs, le chirurgien a associé à la ganglionectomie l'extirpation des nerfs splanchniques et de la glande surrénale homolatérale.



ganglionnaires présente un aspect normal; dans de rares éléments nerveux seulement, on a observé une certaine prolifération des cellules capsulaires se traduisant par leur augmentation en volume et en nombre. On a constaté en outre la présence de rares cellules comportant deux noyaux, de cellules présentant une hyperplasie minime des dendrites et enfin de très rares cellules dont le cytoplasme présente les signes d'une vacuolisation initiale et très peu importante.

L'intérêt de ce cas réside dans le fait qu'à la pauvreté de la symptomatologie clinique correspond une image ganglionnaire normale dans son ensemble. Il faut toutefois souligner l'hyperplasie des cellules capsulaires; ce phénomène, comme on le verra par la suite, représente l'une des premières modalités par laquelle la cellule nerveuse répond aux stimuli excessifs se portant sur son protoplasme.

*Cas 2. — G. C., 52 ans.* Ce deuxième cas de maladie de Bürger au membre inférieur gauche est parfaitement superposable, l'âge du patient excepté, au premier cas soit en ce qui concerne la gravité clinique de la maladie (symptomatologie minime), soit en ce qui concerne l'intervalle qui sépare les premières manifestations cliniques de l'intervention chirurgicale (1 mois).

On a examiné 23 coupes microscopiques concernant le ganglion coeliaque gauche et les deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. L'examen révèle que la majorité des cellules nerveuses ganglionnaires présente une morphologie normale par rapport à l'âge du patient. Seulement par places on constate la présence de rares cellules nerveuses entourées par des cellules capsulaires volumineuses et très nombreuses; on voit aussi quelques cellules nerveuses notablement hypertrophiées et présentant une prolifération très importante de leurs prolongements dendritiques. Parmi ces éléments on peut rencontrer des images telles que celles de la Fig. 3 constituées par deux neurones contigus dont les dendrites luxuriants s'entrelacent en formant un enchevêtrement dans lequel il est extrêmement difficile, voire impossible, de distinguer l'appartenance des prolongements au neurone respectif.

Dans l'ensemble l'étude microscopique de ce cas confirme assez fidèlement les données constatées dans le cas précédent, à savoir: morphologie normale pour la plupart des cellules nerveuses ganglionnaires, en quelques endroits prolifération importante des cellules capsulaires, ailleurs présence de quelques neurones marqués par l'hypertrophie notable de leurs prolongements. Il paraît utile de souligner que la morphologie ganglionnaire, d'après les données qui émergent des deux premiers cas, semble en rapport soit avec une symptomatologie clinique très légère, soit avec une maladie de Bürger qui dure depuis très peu de temps (1 mois); il reste pour le moment en suspens, et à établir par les observations successives, lequel de ces deux facteurs joue le rôle le plus important sur les modifications des cellules ganglionnaires. Le seul fait qui peut être considéré comme acquis dès maintenant est représenté par les images morphologiques qui témoignent de la réaction initiale des neurones aux stimuli en cours d'évolution de la maladie de Bürger, à savoir: l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules capsulaires, la prolifération des prolongements dendritiques.

*Cas 3. — F. M., 36 ans.* Le malade est frappé depuis 3 mois de maladie de Bürger au membre inférieur gauche. Du dossier clinique il apparaît évident que la symptomatologie est un peu plus importante par rapport aux deux cas

précédents. En effet, en dehors des douleurs typiques qui caractérisent la maladie, le patient présente aussi un ulcère torpide à la face plantaire de l'orteil gauche.

Il a été examiné au microscope une vingtaine de coupes du ganglion coeliaque gauche et des deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. Dans ce cas aussi on a constaté, à côté de la majorité des cellules nerveuses présentant un aspect normal, un certain nombre d'éléments caractérisés par l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules capsulaires. Comme dans le cas 1, on a observé de très rares neurones dont le cytoplasme présentait les signes évidents d'une vacuolisation initiale; de plus, et cela représente une constatation morphologique nouvelle par rapport aux deux cas déjà décrits, on a aussi remarqué quelques rares cellules nerveuses entièrement dégénérées et détruites. Il faut souligner le fait que la présence de cellules dégénérées est toujours un phénomène d'ordre pathologique; en effet, chez les individus d'âge assez avancé mais n'ayant jamais souffert de troubles portant atteinte aux ganglions nerveux, on rencontre parfois des cellules «corrodées» mais non pas de cellules entièrement dégénérées.

*Cas 4. — M. M., 54 ans.* Le patient est atteint depuis 4 mois de maladie de Bürger au membre inférieur droit. L'examen du dossier clinique de ce malade est particulièrement intéressant. Même si la maladie date depuis peu de temps (à peu près comme chez les deux sujets précédents, cas 2 et 3), la symptomatologie clinique par contre est particulièrement grave; à cause des douleurs très intenses le patient ne peut plus marcher et est complètement grabataire depuis deux mois. Les différents examens pratiqués au malade confirment objectivement cet état de gravité; en effet, l'oscillométrie montre l'absence d'oscillations du genou à l'extrémité distale; l'artériographie met en évidence une obstruction de l'artère fémorale au tiers distal et les deux tronçons de l'artère paraissent reliés entre eux par un système dérivatif collatéral bien développé; la vitesse du débit sanguin est aussi notablement ralentie.

Il a été examiné 47 coupes microscopiques du ganglion coeliaque droit et des deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. Nombre de cellules paraissent plus ou moins intensément lésées: certaines d'entre elles sont frappées par des phénomènes prolifératifs, d'autres par des phénomènes dégénératifs. Les



Fig. 1. Cellule nerveuse ganglionnaire coeliaque d'un sujet de 54 ans; maladie de Bürger à symptomatologie douloureuse très intense. Le neurone est pourvu d'un appareil parapythaire assez complexe constitué par des fenêtres péri-cellulaires. L'état réactionnel prolifératif du neurone est en outre révélé par les dendrites hypertrophiés et hyperplasiés qui s'en détachent. Méth. Bielschowsky-Gros

phénomènes prolifératifs sont matérialisés d'une part par l'hyperplasie très marquée des cellules capsulaires (Fig. 14<sup>1</sup>), de l'autre par l'hypertrophie du pyrénophore, l'hypertrophie et l'hyperplasie des prolongements cellulaires (Fig. 3). Parfois la prolifération des prolongements devient encore plus marquée et aboutit à l'aspect fenêtré du corps cellulaire (Fig. 1) ou à la formation d'appendices se terminant à leur extrémité par des massues plus ou moins volumineuses (Fig. 6). Dans d'autres cas la prolifération frappant deux cellules voisines réalise la formation d'un pont cytoplasmique reliant matériellement les deux neurones con-

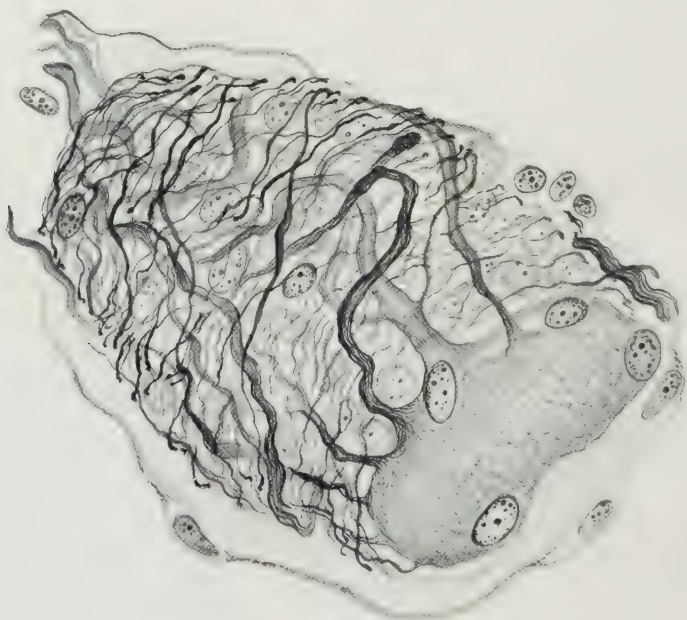


Fig. 2. Cellule nerveuse sympathique du ganglion coeliaque; sujet de 46 ans atteint de forme grave de maladie de Bürger. L'état prolifératif du neurone est témoigné par l'hyperplasie en buisson des dendrites dirigés tous dans la même direction et par l'hyperplasie des cellules satellites. Méth. de Cajal-De Castro

tigus (au sujet de la signification de cette dernière image voir à la p. 529—530). Les phénomènes dégénératifs atteignent chez ce patient un degré assez élevé, soit par le nombre des éléments nerveux qui en sont frappés, soit par les aspects de cette dégénérescence. On a pu constater qu'en règle générale les phénomènes dégénératifs frappent en premier lieu la partie la plus périphérique du cytoplasme, où l'on voit apparaître un certain nombre de vacuoles; celles-ci s'étendent graduellement et envahissent peu à peu tout le cytoplasme (Fig. 18.) Dans certains cas le noyau reste encore visible et garde dans l'ensemble un aspect normal tout en étant entouré de vacuoles; dans d'autres cas la vacuolisation progresse ultérieurement, le noyau en est aussi frappé et sa membrane disparaît, les vacuoles se désagrègent et la cellule tout entière se fragmente enfin, se transformant en des amas argentophiles plus ou moins volumineux et intensément imprégnés (Fig. 25, 26 cellule d'en bas).

<sup>1</sup> Tous les dessins de ce travail ont été exécutés par M. MARIO ALFONSI.



L'intérêt essentiel de ce cas réside donc dans le fait qu'il démontre d'une manière très évidente la stricte relation entre la gravité clinique de la maladie d'une part et les lésions ganglionnaires de l'autre.

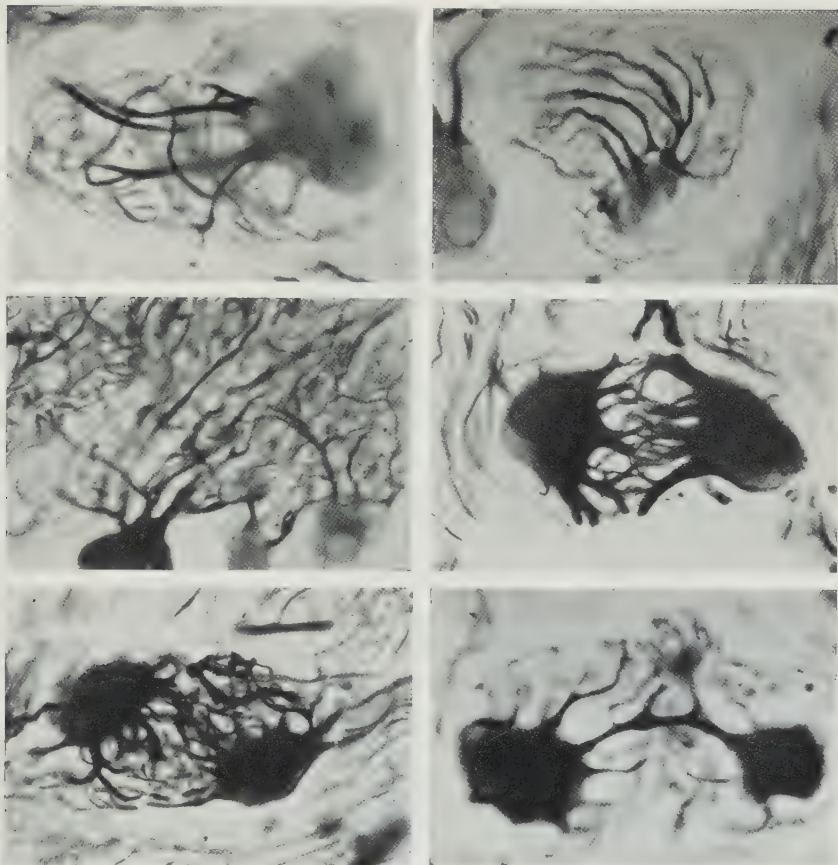


Fig. 3. Neurones sympathiques appartenant à différents sujets souffrant de maladie de Buerger. Les cellules sont frappées par des phénomènes prolifératifs assez intenses: hyperplasie en buisson des prolongements dendritiques, brousaille formée par les prolongements hypertrophiés et hyperplasiés de deux ou plusieurs neurones. — La dernière image (en bas, à droite) montre un pont anastomotique entre les dendrites de deux cellules contiguës; le pont réalise la continuité matérielle entre les deux neurones dont l'individualité est par conséquent effacée. Il s'agit d'une image plutôt rare qui témoigne d'un état de nature pathologique frappant les neurones. Les deux cellules appartiennent au ganglion cervical inférieur d'un sujet de 28 ans souffrant d'une forme grave de Buerger au membre supérieur. Méth. Bielschowsky-Gros

*Cas 5. — Z. G., 52 ans.* Le patient a été frappé de maladie de Buerger au membre inférieur gauche il y a trois ans; l'état était grave et comportait entre autres des lésions nécrotiques à l'extrémité distale du pied; le patient a été amputé au tiers inférieur de la cuisse.

Depuis 4 mois la symptomatologie clinique se rapportant à la maladie de Buerger a réapparu, cette fois au membre inférieur droit. Les douleurs sont assez violentes; au niveau des orteils il existe des lésions dystrophiques. L'oscillométrie met en évidence une diminution notable des pulsations de la paroi artérielle.

Il a été examiné au microscope 20 coupes du ganglion cœliaque droit et des deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. La morphologie ganglionnaire est caractérisée notamment par des phénomènes prolifératifs assez

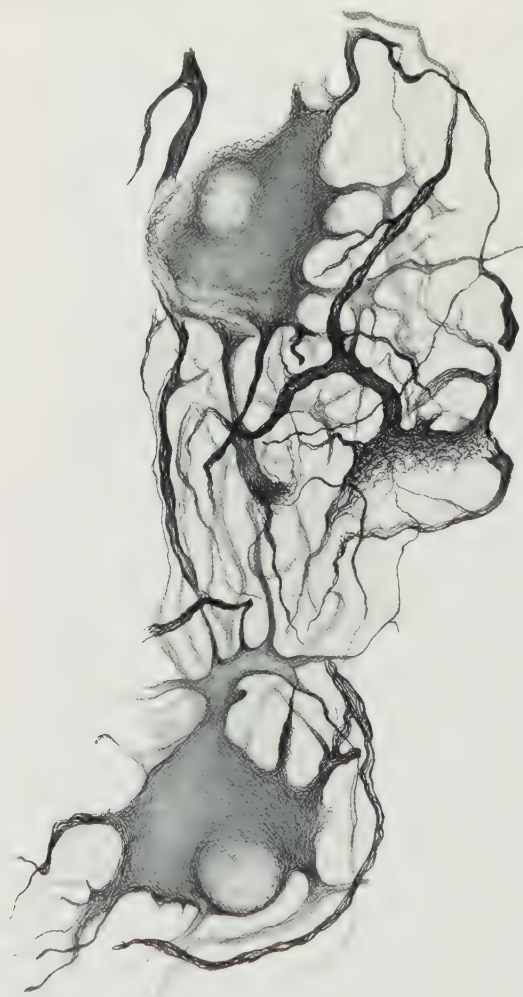


Fig. 4. Cellules nerveuses ganglionnaires cœliaques appartenant à un sujet de 47 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bûrger. L'état prolifératif des neurones est témoigné par l'hypertrophie et l'hyperplasie des dendrites. Méth. Bielschowsky-Gros

marqués se traduisant par une hypertrophie des prolongements dendritiques, hypertrophie et hyperplasie remarquables des cellules capsulaires. Par contre les phénomènes dégénératifs semblent presque absents.

Ce cas semblerait donc ne pas confirmer la donnée constatée dans la majorité des cas, objet de cette étude, c'est à dire l'existence d'un rapport direct entre la gravité de la symptomatologie clinique et celle des lésions ganglionnaires. Mais il s'agit d'une discordance plus apparente que réelle. En effet, malgré la clinique assez accusée, c'est la morphologie ganglionnaire qui renseigne d'une manière objective sur le degré réel de gravité. Chez ce patient, dont la morphologie ganglionnaire était très peu lésée, on a constaté quelques mois après l'intervention que toutes les douleurs et les lésions dystrophiques avaient disparu. Les statistiques chirurgicales renseignent que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la résection ganglionnaire est réalisée au stade initial de la maladie: c'est justement le stade caractérisé par des modifications ganglionnaires peu importantes.

*Cas 6. — M. G., 45 ans.* Le patient est atteint de maladie

de Bûrger au membre inférieur droit depuis environ 6 mois. La symptomatologie clinique est assez marquée, et confirmée entre autres par l'artériographie qui met en évidence une interruption nette de la lumière de l'artère fémorale au niveau de son tiers distal; à ce même niveau la circulation collatérale de suppléance est bien développée.

Il a été examiné 40 coupes microscopiques concernant le ganglion cœliaque droit et les deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. On a

constaté que nombre de neurones présentent des phénomènes prolifératifs et dégénératifs assez remarquables. Les premiers l'emportent nettement et se traduisent par l'hypertrophie du pyrénophore, l'hyperplasie des dendrites, un épaississement important de la capsule péricellulaire s'accompagnant d'une augmentation notable du nombre des cellules capsulaires. Les phénomènes dégénératifs sont matérialisés par la présence de cellules corrodées, de neurones ratatinés et réduits à un petit amas argentophile homogène, de neurones transformés en blocs argentophiles fragmentés et enfin par un certain nombre de dendrites vacuolisés le long de leur trajet. Cette dernière image, qui n'a pas été observée dans les cas précédents, témoigne à notre avis d'un état assez important de souffrance neuronale. En effet, puisque les dendrites frappés par la vacuolisation ne sont pas à même de conduire l'influx nerveux, il est évident que les neurones présentant des modifications semblables sont hors circuit nerveux et sont par conséquent superposables à une cellule très dégénérée au niveau de son pyrénophore (pour des considérations plus détaillées concernant la vacuolisation neuronale, voir p. 535).

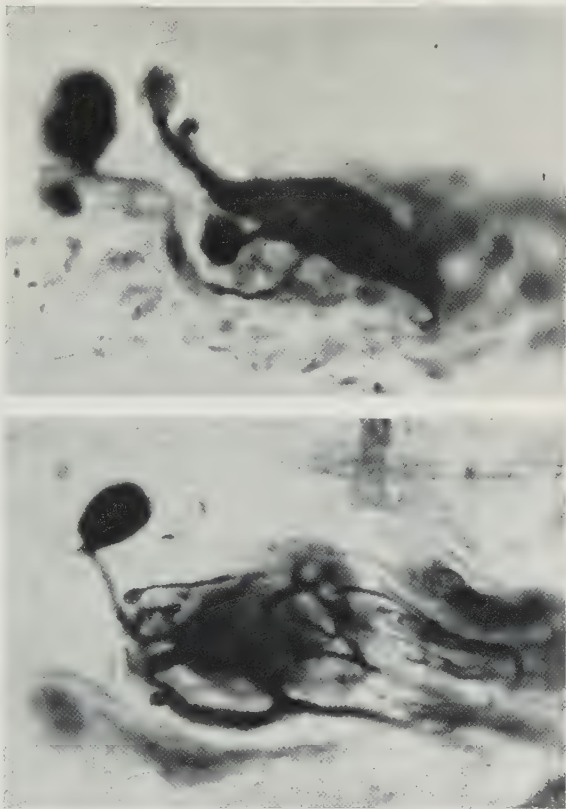


Fig. 5. Cellules ganglionnaires cardiaques d'un sujet de 31 ans (cœur hypertrophique). De grosses massues se trouvent à l'extrémité distale de certains dendrites. D'autres pédoncules, pourvus eux aussi de renflements terminaux, se détachent des cellules. Ces appendices à boule terminale rentrent dans la variété  $\alpha$ . décrite dans le texte. Méth. Bielschowsky-Gros

*Cas 7. — M. S., 40 ans.* La malade est atteinte depuis 10 mois de maladie de Bürger au membre inférieur gauche. La symptomatologie douloureuse est plutôt modeste, objectivement confirmée par les examens oscillométriques et oscillographiques.

Il a été examiné 5 coupes du ganglion coeliaque gauche. Dans de rares neurones seulement on a observé des signes de nature irritative. Le contour du pyrénophore paraît parfois festonné, quelques prolongements cytoplasmiques présentent à leur extrémité des renflements et des massues terminales. Des phénomènes d'hyperplasie sont en outre témoignés par le nombre de cellules capsulaires qui, sans doute, est plus élevé que normalement. Aucune cellule ne présente de signes dégénératifs.



Ce cas confirme donc ce qu'on a déjà constaté dans les cas précédents, c'est à dire que le facteur «gravité clinique de la maladie» va de pair avec l'importance des modifications ganglionnaires. Si on compare en outre ce cas au 4 et 6, il en résulte que le facteur «durée de la maladie» semble ne pas jouer un rôle important et ne pas être en rapport étroit avec la morphologie ganglionnaire.

*Cas 8. — F. G., 52 ans.* Depuis 11 mois environ le patient est atteint de maladie de Bürger au membre inférieur droit. La symptomatologie douloureuse n'est pas très intense, mais l'oscillographie révèle, par l'absence de toute pulsation, un degré de lésion artérielle marqué.

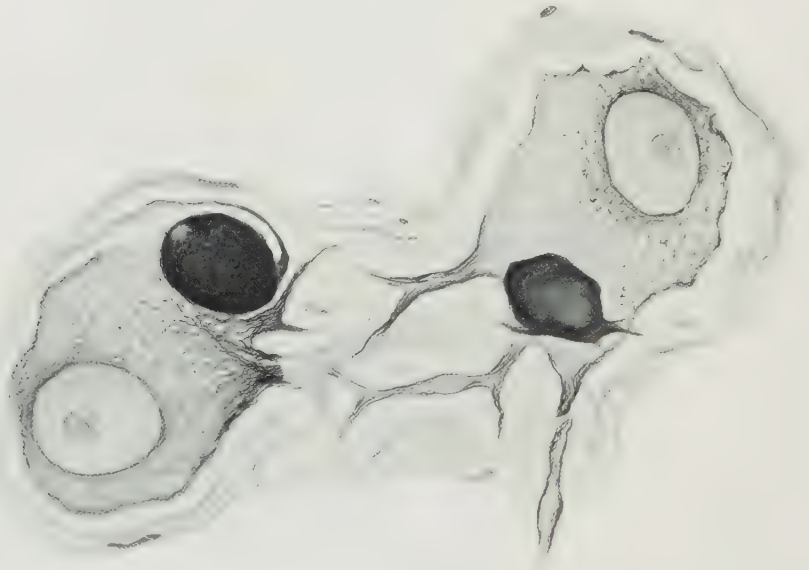


Fig. 6. Deux cellules nerveuses ganglionnaires cœliaques dont les dendrites sont pourvus à leur extrémité distale de massues terminales rentrant dans la variété  $\alpha$ , illustrée dans le texte. Sujet de 54 ans atteint de Bürger grave. Méth. Bielschowsky-Gros

Il a été examiné 14 coupes concernant le ganglion cœliaque droit et les deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. On a observé, dans un certain nombre de neurones, des phénomènes prolifératifs et dégénératifs. Les premiers se traduisent par une satellitose assez importante, qui aboutit parfois à l'étranglement du pyrénophore. Les phénomènes dégénératifs ne sont pas nombreux et consistent notamment en la présence de vacuoles, soit au sein du cytoplasme, soit le long des prolongements nerveux: dendrites, neurite et fibres nerveuses intraganglionnaires.

*Cas 9. — T. M., 43 ans.* Maladie de Bürger depuis une année au membre inférieur gauche; clinique de moyen degré.

L'examen de 32 coupes microscopiques concernant le ganglion cœliaque gauche et les deux premiers ganglions lombaires révèle la présence de phénomènes prolifératifs assez remarquables (satellitose intense), et aussi d'un certain nombre de lésions régressives.

*Cas 10. — V. P., 59 ans.* La patiente souffre depuis une année environ de troubles vasculaires au membre inférieur droit; ces troubles sont un peu vagues

et un diagnostic clinique précis n'a pas été posé. Les troubles sont plutôt modestes et confirmés par les examens thermométrique et oscillométrique indiquant les mêmes valeurs aux deux membres inférieurs.

On a examiné seulement 2 coupes concernant le ganglion cœliaque droit. Dans l'ensemble la forme des pyrénophores est assez régulière; dans un nombre limité de cellules on a constaté des phénomènes hyperplasiques frappant les prolongements cellulaires, ailleurs une satellitose assez marquée. Les neurones ne présentent pas de signes régressifs.



Fig. 7. Cellule nerveuse ganglionnaire du cœur d'un sujet de 18 ans (cœur hypertrophié, poids 600 gr.), région du nœud sinusal. La cellule est pourvue de gros lobes pédonculés (appendices cytoplasmiques néoformés: variété  $\beta$ .) qui rappellent de près les pseudopodes des cellules mobiles. Méth. Bielschowsky-Gros

*Cas 11. — F. E., 54 ans.* Le patient a déjà souffert par le passé de maladie de Bürger au membre inférieur droit et, il y a une année, il a été amputé au tiers moyen de la jambe. Après l'opération il a commencé à souffrir de douleurs au membre inférieur gauche. Depuis lors les douleurs se sont toujours accentuées: dans l'ensemble la symptomatologie clinique peut être considérée de degré moyen.

Il a été examiné seulement 4 coupes du ganglion cœliaque gauche. Dans un certain nombre d'éléments nerveux on a observé des phénomènes prolifératifs (satellitose marquée, hypertrophie et hyperplasie des prolongements, présence de quelques appendices avec massue terminale). La forme et l'aspect de la plupart des neurones sont dans l'ensemble normaux; mais un certain nombre d'entre eux présentent aussi des phénomènes dégénératifs assez évidents consistant

notamment en la présence de vacuoles plus ou moins nombreuses siégeant vers la partie périphérique du cytoplasme; dans certaines cellules le nombre des vacuoles augmente et s'étend graduellement vers le noyau (Fig. 16 et 17).

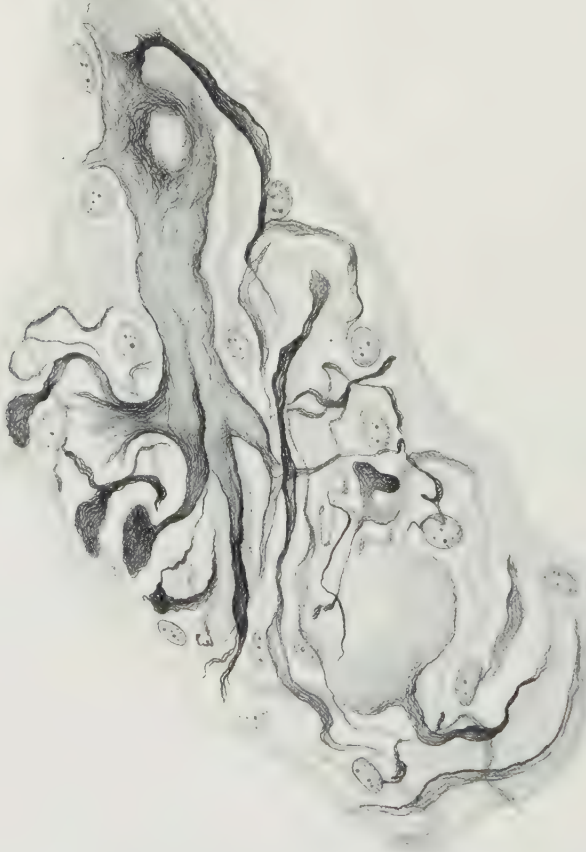


Fig. 8. Neurone sympathique du ganglion coeliaque appartenant à un sujet de 47 ans atteint de forme grave de Bürger. Le neurone est frappé par des phénomènes prolifératifs intenses matérialisés entre autres par la présence d'appendices cytoplasmiques néoformés (variété  $\beta$ . décrite dans le texte) se terminant à leur extrémité par une partie neurofibrillaire gonflée ayant une forme variable. Méth. Bielschowsky-Gros

*Cas 12. — C. F., 45 ans.* La date du début de la maladie n'est pas bien précisée; toutefois le patient souffre depuis un certain nombre d'années de maladie de Bürger au membre inférieur gauche. Par le passé la symptomatologie clinique a toujours été assez grave et le patient a subi toute une série d'amputations graduellement ascendantes jusqu'au niveau du tiers moyen de la cuisse gauche.

Il a été examiné 13 coupes microscopiques du deuxième ganglion de la chaîne sympathique lombaire gauche. On a constaté toute la série des phénomènes progressifs mais aussi des réactions régressives neuronales. Ces dernières l'emportent très nettement sur les phénomènes prolifératifs; elles frappent notamment les



fibres nerveuses intraganglionnaires qui tendent à se fusionner pour former des cordons épais, intensément argentophiles, étranglés par places en chapelet. A certains endroits du ganglion les altérations régressives se traduisent par la présence de nombreuses vacuoles échelonnées tout le long des fibres nerveuses.

*Cas 13. — S. G., 46 ans.*

Depuis 3 ans environ le patient est atteint de forme grave de la maladie de Bürger au membre inférieur droit; pendant cette période il a été hospitalisé plusieurs fois. Les douleurs très intenses provoquées par la maladie ont fait du patient un toxicomane acharné.

Il a été examiné au microscope 7 coupes concernant le ganglion coeliaque droit et le premier ganglion de la chaîne sympathique lombaire. On constate des phénomènes prolifératifs et régressifs très importants. Les premiers se traduisent par une hypertrophie notable du corps cellulaire, hypertrophie et hyperplasie des prolongements dendritiques, satellitose remarquable (Fig. 11). Dans certains neurones la prolifération des prolongements cellulaires se dirige en forte prédominance vers un pôle de la cellule qui acquiert ainsi une image «en buisson» hautement caractéristique (Fig. 2 et 3). Certains neurones présentent des phénomènes de vacuolisation assez accusée (Fig. 20); par places on voit des cellules nerveuses dont le cytoplasme est bourré de micro-vacuoles strictement tassées les unes contre les autres et masquant entièrement toute structure neurofibrillaire.

*Cas 14. — P. A., 21 ans.* Ce patient souffre depuis 4 ans environ de troubles vasculaires frappant simultanément les deux membres inférieurs, avec une prédominance gauche; la symptomatologie clinique, peu importante, a été toujours vague, ce qui n'a pas permis de poser un diagnostic clinique précis: le chirurgien cependant était orienté vers la maladie de Bürger.



Fig. 9. Neurone du ganglion cervical inférieur d'un sujet de 28 ans; forme grave de Bürger. Autour du pyrénophore on constate la présence d'appendices neurofibrillaires pourvus de masses terminales. Ces appendices rentrent dans la variété  $\gamma$ , décrite dans le texte: il s'agit de fibres nerveuses intraganglionnaires dont la réaction irritative se traduit par l'émission de boudons terminaux à l'extrémité distale qui réalise la synapse; leur présence témoigne d'un état de souffrance neuronale. Méth. Bielschowsky-Gros

Il a été examiné 12 coupes concernant le ganglion coeliaque gauche et le troisième ganglion de la chaîne sympathique lombaire. Au microscope la morphologie des cellules nerveuses ganglionnaires ne présente pas de modifications particulièrement importantes. Toutefois nombre de neurones sont entourés d'une capsule hypertrophiée dans son composant fibrillaire et fortement hyperplasiée dans son composant cellulaire; dans certains cas les fibrilles et les cellules satel-

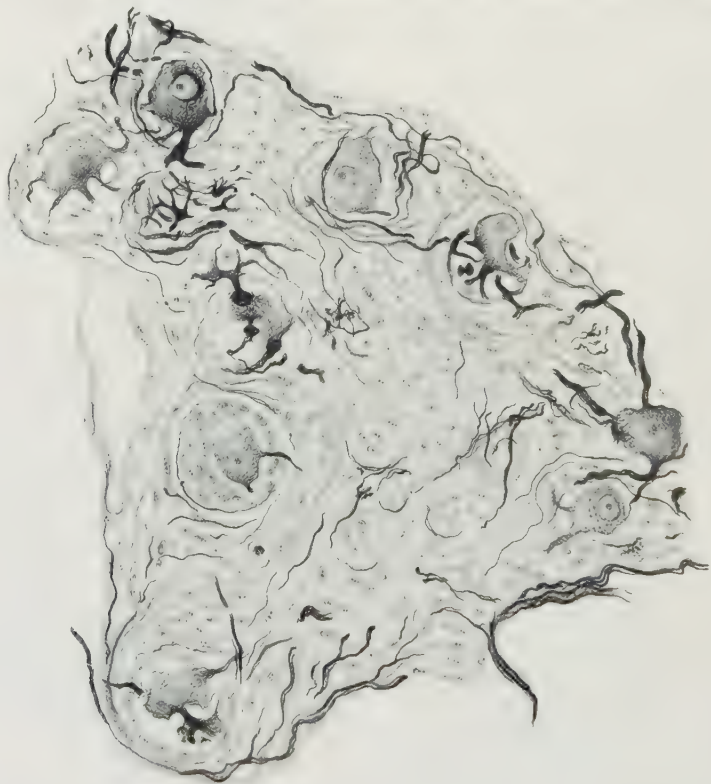


Fig. 10. Ganglion coeliaque d'un individu de 48 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger. Le phénomène qui frappe le plus est représenté par l'hyperplasie marquée des cellules satellites: ces cellules forment, autour de quelques neurones, une véritable capsule cellulaire qui étrangle le pyrénophore. Quelques neurones sont presque entièrement dégénérés. Méth. Bielschowsky-Gros

lites compriment et étranglent notablement le pyrénophore. Par places on constate la présence d'un certain nombre de neurones dont les contours semblent nettement festonnés; on peut rencontrer de tels éléments chez les individus normaux en âge avancé, mais à celui de ce malade leur présence est clairement d'ordre pathologique.

*Cas 15. — S. N., 48 ans.* Ce patient souffre depuis 6 ans de maladie de Bürger au membre inférieur droit. Les douleurs très fortes et les examens qu'il a subis (oscillométrie, oscillographie, thermométrie) témoignent d'un état grave de la maladie. L'artériographie a mis en évidence une obstruction nette de l'artère fémorale entre son tiers moyen et son tiers distal; les deux tronçons artériels sont réunis par une circulation collatérale dérivative assez bien développée. Depuis 2 ans la même maladie a aussi frappé légèrement le membre inférieur gauche.

Il a été examiné 34 coupes du ganglion cœliaque droit et des deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. Au microscope on voit toute la gamme des modifications neuronales prolifératives et régressives, qui sont parfois associées dans le même neurone. Les phénomènes prolifératifs sont matériali-

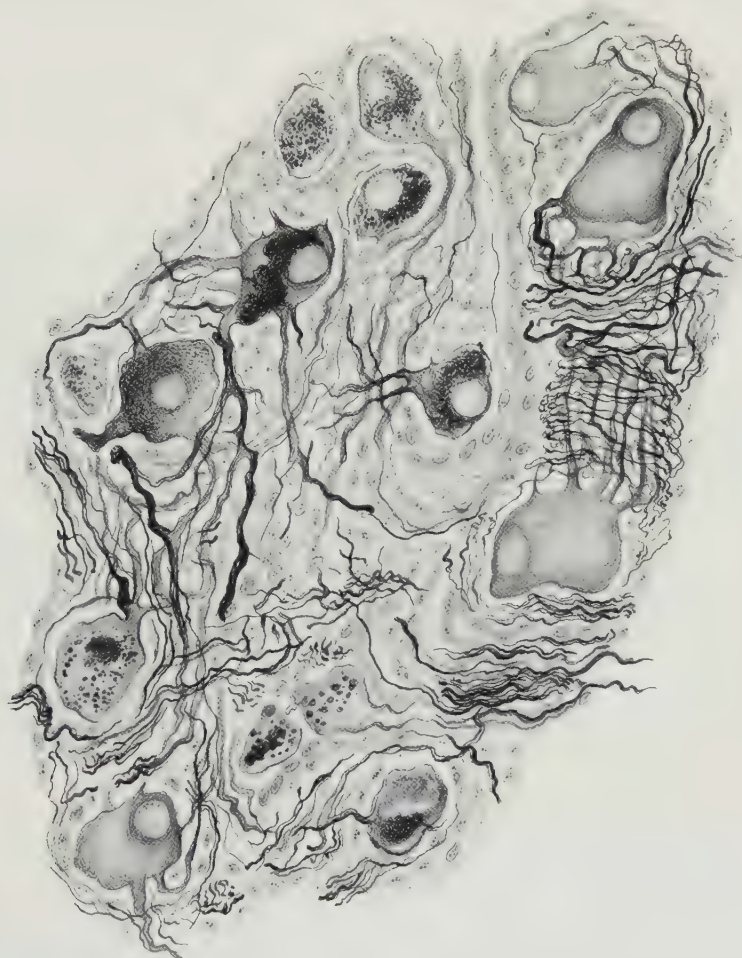


Fig. 11. Ganglion cœliaque d'un sujet de 46 ans atteint de forme grave de maladie de Bürger. Certains neurones sont frappés par des phénomènes prolifératifs très marqués; d'autres présentent des lésions dégénératives manifestes. Partout satellitose importante. Méth. Bielschowsky-Gros

sés par le volume notable du pyrénophore, par l'abondance des dendrites dont la longueur, le volume et la taille sont remarquables; certains d'entre eux se terminent sous forme de gonflements ou de formations neurofibrillaires rondes et assez volumineuses. Les phénomènes prolifératifs sont encore témoignés par un épaissement notable des fibrilles capsulaires péri-cellulaires et parfois aussi par une hyperplasie très importante des cellules satellites (Fig. 10 et 12). Les images régressives (Fig. 10) sont polymorphes. On voit tous les degrés de vacuolisation: vacuolisation cytoplasmique initiale limitée à la périphérie du corps cellulaire; vacuolisation plus marquée qui s'étend graduellement et occupe la



cellule entière en détruisant l'appareil neurofibrillaire: étranglement et destruction du noyau par des vacuoles. D'autres neurones sont marqués par un rongement et une corrosion périphérique; on voit parfois des pyrénophores transformés en amas argentophiles plus ou moins volumineux, entre lesquels on peut encore reconnaître des restes du noyau (Fig. 24); parfois au contraire ces débris nucléaires ne sont plus reconnaissables. Dans certains cas les phénomènes régressifs sont matérialisés par une morphologie différente et reproduisent ces images haute-

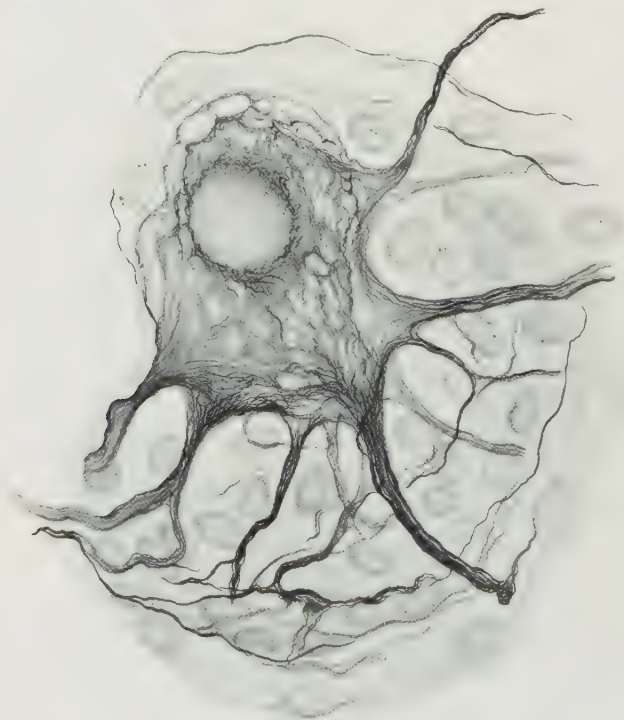


Fig. 12. Cellule nerveuse ganglionnaire coeliaque; sujet de 48 ans; forme grave de Bürger. Hyperplasie notable des cellules satellites. Méth. Bielschowsky-Gros

ment caractéristiques que les auteurs Allemands appellent «Tumorgewebe»: les résidus de la cellule nerveuse sont submergés et partiellement masqués par les cellules satellites, les fibrilles capsulaires et les prolongements nerveux hypertrophiés, hyperplasiés et fragmentés.

On n'a pas fait de recherches particulières pour déterminer exactement le nombre des cellules nerveuses lésées et leur pourcentage par rapport à la totalité des cellules ganglionnaires. Il est vraisemblable toutefois qu'on n'est pas loin d'une approximation objective en affirmant que le nombre des éléments ganglionnaires altérés en sens dégénératif devrait représenter environ le 25—30% de la totalité des éléments nerveux du ganglion.

*Cas 16.* — *D. P. M.*, 47 ans. Le patient souffre depuis 8 ans environ de troubles vasculaires périphériques aux membres inférieurs se rapportant à la maladie de Bürger. Depuis trois ans il souffre de la même affection également aux membres supérieurs. Pendant cette longue période les douleurs se sont atténuées par

intervalles, mais dans l'ensemble la maladie s'est constamment aggravée. Au moment de l'hospitalisation pour intervention chirurgicale, la maladie a atteint un haut degré que confirment les examens artériographiques aux deux membres inférieurs. Le malade a été opéré du côté gauche, d'une part parce que la symptomatologie douloureuse était plus intense de ce côté, de l'autre parce qu'au niveau de l'extrémité distale du membre inférieur gauche il existait aussi des lésions dystrophiques assez accusées.

Il a été examiné 40 coupes microscopiques du ganglion cœliaque gauche et des trois premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. Dans ce cas, comme dans le cas 15, on a constaté la présence d'images prolifératives et régres-

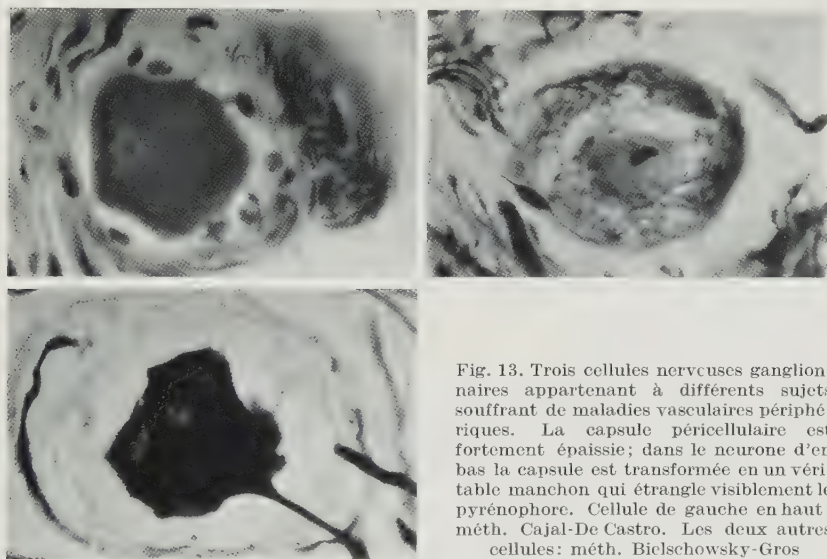


Fig. 13. Trois cellules nerveuses ganglionnaires appartenant à différents sujets souffrant de maladies vasculaires périphériques. La capsule péricellulaire est fortement épaissie; dans le neurone d'en bas la capsule est transformée en un véritable manchon qui étrangle visiblement le pyrénophore. Cellule de gauche en haut: méth. Cajal-De Castro. Les deux autres cellules: méth. Bielschowsky-Gros

sives assez importantes, bien souvent associées les unes aux autres dans le même neurone. La réaction proliférative se traduit notamment par une augmentation notable en nombre et en volume des prolongements dendritiques (Fig. 4), par l'apparition d'appendices à massues terminales (Fig. 8), par un pelotonnement spiralé des prolongements cellulaires autour du pyrénophore, et enfin par une prolifération remarquable de la capsule péricellulaire s'accompagnant d'une satellitose intense. Les phénomènes régressifs sont notamment témoignés par les images suivantes: vacuolisation du corps cellulaire, érosion et corrosion périphériques du pyrénophore (Fig. 19), fragmentation du corps cellulaire se transformant graduellement en amas argentophiles qui sont parfois submergés et masqués par les cellules capsulaires notablement proliférées.

*Cas 17.* — *B. A., 28 ans.* Le patient souffre depuis 2 mois de maladie de Bürger au membre supérieur gauche. La symptomatologie douloureuse est très violente, la musculature squelettique du membre est hypotrophique. Au niveau de l'extrémité distale des doigts on constate des zones nécrotiques assez étendues; toute pulsation artérielle a entièrement disparu, l'artériographie n'arrive pas à mettre en évidence les artères, la thermométrie révèle une diminution sensible

de la température de tout le membre supérieur gauche. Le membre supérieur droit est aussi atteint depuis un an et demi de la même maladie mais sous forme sensiblement plus légère.

Il a été examiné douze coupes microscopiques concernant le ganglion cervical inférieur gauche et le premier ganglion thoracique. Les modifications prolifératives et dégénératives sont très abondantes; dans la plupart des neurones lésés on constate la concomitance des deux sortes de modifications (Fig. 27), mais

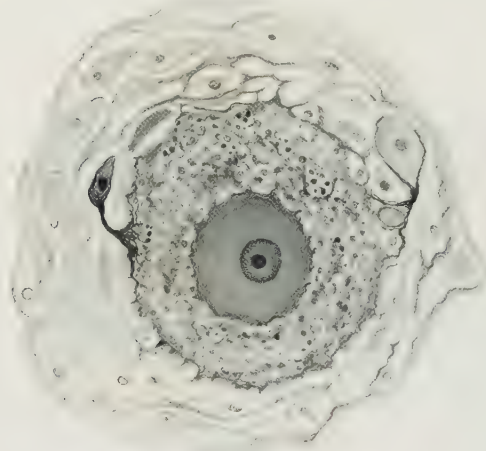


Fig. 14. Cellule nerveuse ganglionnaire cœliaque appartenant à un sujet de 54 ans; Bürger grave. Les cellules capsulaires sont fortement augmentées en nombre et envahissent la partie périphérique du protoplasme neuronal qui, de son côté, est frappé par des phénomènes dégénératifs assez graves. Méth. Bielschowsky-Gros

dans l'ensemble les phénomènes dégénératifs prédominent nettement sur les phénomènes de prolifération.

Les phénomènes prolifératifs se présentent sous les aspects les plus variés. Les prolongements dendritiques hypertrophiés et hyperplasiés sortent parfois d'un seul pôle de la cellule et se dirigent dans une seule direction (Fig. 3); parfois les prolongements de deux ou plusieurs cellules s'arborescent et s'entrecroisent entre eux pour former des buissons compliqués (Fig. 3). Tantôt la prolifération se manifeste par la présence d'un pont cytoplasmique réalisant la continuité matérielle entre les prolongements de deux neurones contigus (Fig. 3). Il n'est pas rare enfin de constater la présence de cellules nerveuses pourvues d'appendices munis de massues terminales.

En ce qui concerne la capsule péricellulaire, elle est notablement épaissie dans un certain nombre de neurones et forme un manchon qui étrangle la cellule nerveuse (Fig. 13).

Quant aux phénomènes régressifs on a observé toutes les images possibles de dégénérescence cellulaire. A partir d'images reproduisant les phénomènes dégénératifs initiaux (vacuolisation périphérique, corrosion des bords du corps cellulaire), on passe à des phénomènes nettement plus marqués: la vacuolisation s'étend et envahit tout le cytoplasme, le noyau présente des signes de souffrance se traduisant avant tout par la disparition de sa membrane, les neurofibrilles se réunissent en amas volumineux qui se fragmentent par la suite. On observe enfin les images de la régression cellulaire la plus avancée aboutissant d'une part à la fragmentation totale du cytoplasme, de l'autre à son homogénéité et à son aspect totalement pulvérulent. Ces images dégénératives ne se présentent pas toujours isolément, mais le plus souvent plusieurs d'entre elles coexistent au sein du même neurone dont la morphologie en est alors modifiée de la façon la plus polymorphe (Fig. 28, 29 et 32). En ce qui concerne le pourcentage des éléments nerveux frappés par des modifications dégénératives par rapport au nombre total des cellules ganglionnaires, on n'a pas fait de recherches précises dans ce



but; il semble toutefois qu'on peut retenir comme assez probable le chiffre de 25—35%. En observant au microscope les ganglions on a parfois constaté la présence de champs microscopiques où presque toutes les cellules étaient altérées.

Une autre donnée morphologique qui témoigne d'une manière évidente du haut degré de lésion atteint par le ganglion est représentée par les images reproduites dans les Fig. 22 et 23. On y constate la présence de nodosités plus ou moins

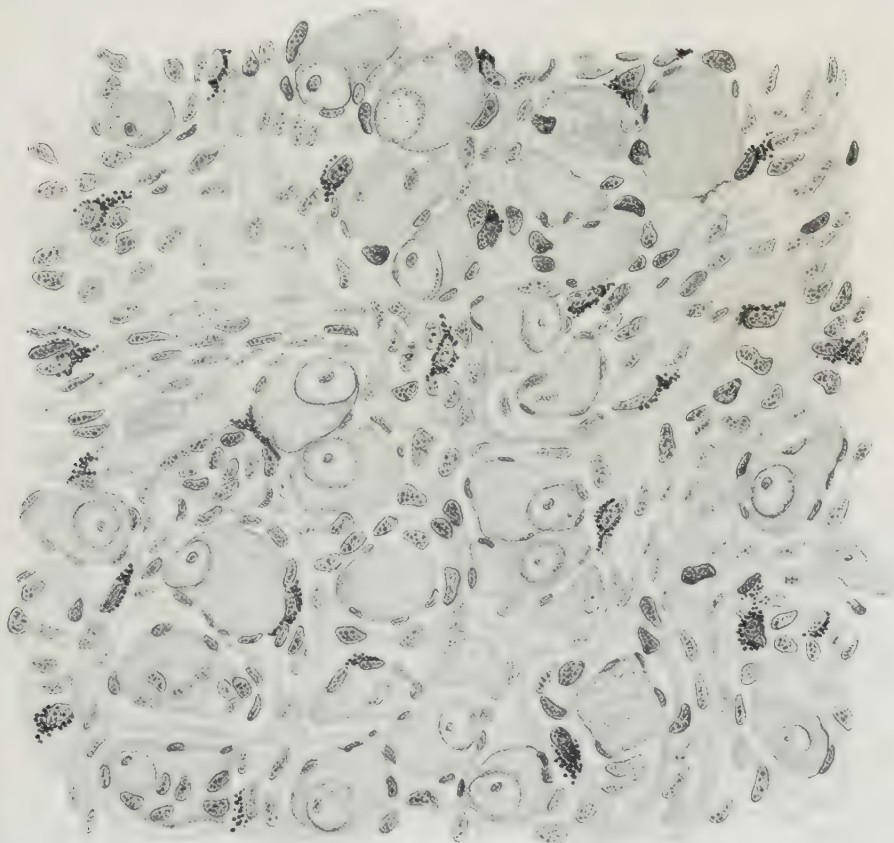


Fig. 15. Ganglion nerveux de la chaîne sympathique latéro-vertébrale d'un chien. Coloration vitale au Trypan Blau. Nombre de cellules capsulaires et interstitielles ont emmagasiné des grains de colorant: ce sont des cellules de type histiocytaire. Coloration nucléaire au carmin

nettement vacuolisées échelonnées soit le long des prolongements se détachant directement du pyrénophore, soit le long des fibres intraganglionnaires; par places ces nodosités reproduisent l'image typique d'un chapelet, ailleurs les dendrites vacuolisés prennent la forme de cylindres creux. Parmi ces nodosités il y en a d'intensément argentophiles, tandis que d'autres reproduisent clairement l'image d'une vacuole; dans un cas comme dans l'autre les neurofibrilles semblent avoir disparu et par conséquent les prolongements nerveux comportant de telles modifications sont incapables de toute conduction nerveuse.

Dans l'ensemble l'examen de ce cas confirme d'une part pour le membre supérieur et pour les ganglions sympathiques qui sont en relation avec lui l'existence d'un lien d'interdépendance assez étroit entre la gravité des lésions

ganglionnaires et la gravité de la symptomatologie clinique. D'autre part si l'on compare les images observées dans ce ganglion cervical inférieur aux images observées dans les ganglions sympathiques lombaires ou coeliaque d'un sujet présentant à peu près la même gravité clinique, il ressort que le ganglion cervical

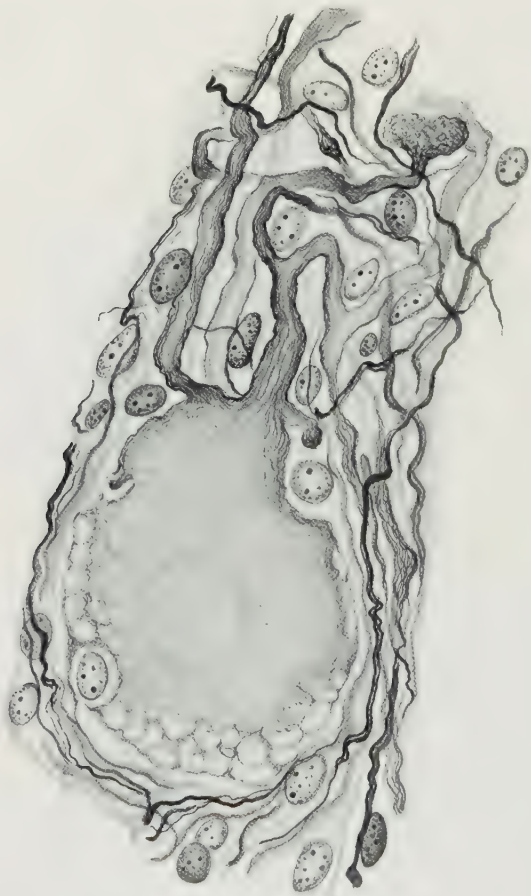


Fig. 16. Cellule nerveuse ganglionnaire (ganglion cervical inférieur) d'un sujet de 28 ans souffrant d'une forme grave de *Bürger*. On constate l'hypertrophie des dendrites (l'un d'entre eux est pourvu de massue terminale) et une vacuolisation cytoplasmique initiale frappant la partie périphérique de la cellule. Méth. Bielschowsky-Gros

inférieur présente des modifications progressives et régressives plus manifestes que celles d'un ganglion lombaire ou coeliaque. On peut donc penser que les ganglions cervicaux sont moins résistants et plus labiles aux stimuli anormaux. Cette constatation, qui ressort d'une étude histo-pathologique, s'accorde avec d'anciennes observations portant sur le même matériel dans des conditions normales. En effet, LEVI (1954) a démontré que les modifications qui se passent dans le ganglion cervical supérieur au cours de la sénescence physiologique sont remarquablement plus importantes par rapport aux transformations que subissent les autres ganglions de la chaîne sympathique latéro-vertébrale.

*Cas 18. — C. V., 21 ans.* La patiente souffre depuis un an et demi de maladie de Raynaud au membre supérieur gauche; la gravité clinique de la maladie peut être considérée de moyen degré.

Il a été examiné 26 coupes microscopiques du ganglion stellaire gauche. Les modifications morphologiques sont essentielle-

ment d'ordre prolifératif et se traduisent surtout par une hypertrophie notable d'un grand nombre de cellules; celles-ci sont sans doute plus développées, en ce qui concerne le volume et le nombre des prolongements, que des cellules normales d'individus du même âge. Dans nombre de neurones les dendrites hypertrophiés se déplacent en pelotons vers l'un des pôles de la cellule, et forment de riches arborisations en broussaille. Dans certains éléments nerveux, seuls les prolongements dendritiques sont frappés par l'hyperplasie. Dans d'autres par contre, cette prolifération s'associe à une hyperplasie et à une hypertrophie de

tous les composants de la capsule péricellulaire. Les éléments nerveux atteints de phénomènes régressifs sont sans doute moins nombreux que ceux qui sont caractérisés par des phénomènes prolifératifs. Par places on constate de rares cellules nerveuses dont la partie périphérique est vacuolisée; on a observé en outre un certain nombre d'éléments nerveux dont la partie proximale de certains des dendrites était plus ou moins intensément vacuolisée.

*Cas 19. — F. B., 42 ans.* Depuis deux ans et demi environ la patiente souffre au membre supérieur droit de troubles se rapportant à la maladie de Raynaud; la symptomatologie douloureuse n'a jamais été très marquée et la patiente a toujours pu supporter ses douleurs.

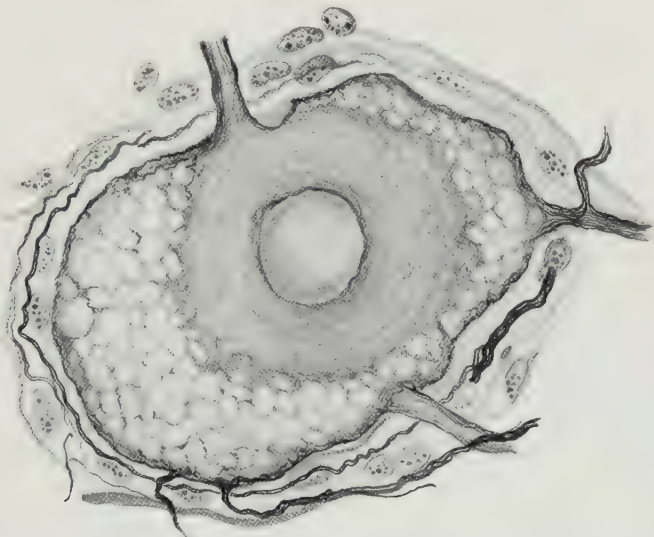


Fig. 17. Cellule nerveuse ganglionnaire du ganglion coeliaque appartenant à un sujet de 54 ans atteint de maladie de Bürger de moyen degré. Par rapport à la figure précédente la vacuolisation cytoplasmique a progressé en détruisant une bonne moitié du réseau neurofibrillaire. Méth. Bielschowsky-Gros

Il a été examiné 9 coupes du premier ganglion thoracique droit. Au microscope les phénomènes prolifératifs prédominent et frappent soit les prolongements qui forment par endroits des touffes notables, soit les cellules satellites de la capsule; ces dernières forment parfois des manteaux assez épais autour du pyrénophore qui en paraît par conséquent étranglé. Les éléments nerveux pourvus de paraphytes (fenêtres péricellulaires, petits appendices en massue terminale), sont assez bien représentés. Il n'est pas rare enfin de rencontrer des éléments atteints de vacuolisation au stade initial.

*Cas 20. — S. G., 55 ans.* Maladie de Raynaud depuis 5 ans environ: le patient souffre de crises syncopales assez intenses aux membres supérieurs; ces crises se répètent assez fréquemment provoquant des douleurs très intenses. Au niveau de l'extrémité distale des doigts on constate des altérations dystrophiques. L'artériographie montre une image normale des deux côtés.

Il a été examiné six coupes du ganglion cervical inférieur. Les pyrénophores paraissent d'aspect normal. La satellitose est peu importante, on ne voit pas de réaction proliférative des dendrites. L'aspect du ganglion est dans l'ensemble presque normal.



*Cas 21. — F. C., 25 ans.* Cette patiente souffre de troubles vasculaires périphériques déterminés par la présence d'une masse cicatricielle importante qui comprime notablement la veine sous-claviaire droite; lors de l'intervention le chirurgien a aussi extirpé, outre la masse cicatricielle, le ganglion cervical inférieur droit.

Il a été examiné 25 coupes du ganglion. Un certain nombre d'éléments nerveux ganglionnaires sont frappés de phénomènes régressifs qui consistent notamment en une vacuolisation de la partie périphérique du cytoplasme; parfois cette

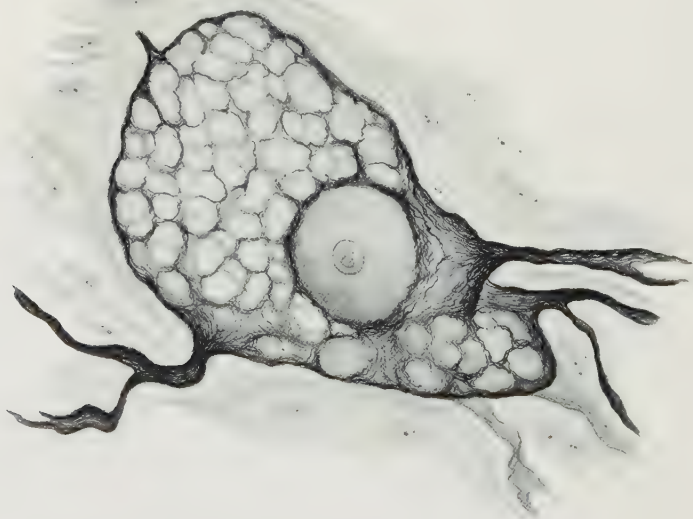


Fig. 18. Cellule nerveuse ganglionnaire lombaire d'un sujet de 54 ans souffrant d'un *Bürger* assez grave. Par rapport à l'image précédente les vacuoles ont ultérieurement progressé et le réseau neurofibrillaire du cytoplasme en est presque entièrement détruit. Méth. Bielschowsky-Gros

vacuolisation s'étend au pyrénophore tout entier. Dans certains champs microscopiques les cellules vacuolisées sont assez nombreuses.

Ce cas n'est pas superposable, quant à l'interprétation des résultats, aux précédents. Il est clair en effet que les phénomènes régressifs de vacuolisation dans les neurones ont été provoqués par la masse cicatricielle qui les comprimait. Il s'agit donc de phénomènes régressifs déterminés simplement par un facteur mécanique (compression) et par conséquent leur genèse paraît tout à fait claire et de nature secondaire.

*Cas 22. — R. C., 55 ans.* L'histoire clinique de ce malade est extrêmement simple. Il n'a jamais souffert de troubles vasculaires périphériques. Tout récemment et en plein hiver (27 décembre) il a passé une nuit entière, pieds nus, à la belle étoile, avec une température de beaucoup inférieure à 0°. Il était en état d'ivresse. Les pieds se sont congelés et, pour obtenir une reprise de la circulation artérielle périphérique, on lui a pratiqué le 22 janvier suivant une sympathectomie lombaire bilatérale. L'intervention chirurgicale n'a apporté aucun avantage; par contre les pieds sont tombés en gangrène et il a subi successivement l'amputation des deux pieds.

Il a été examiné 24 coupes microscopiques concernant les deux premiers ganglions lombaires droits et gauches. Ces ganglions présentent des altérations prolifératives et régressives extrêmement importantes. Les premières sont représentées par une hypertrophie et une hyperplasie notables des prolongements dendritiques, par l'hyperplasie de la capsule fibrillaire péricellulaire et des cellules satellites. Les altérations régressives neuronales sont représentées par la gamme très étendue des lésions les plus graves déjà observées et décrites précédemment: cellules d'aspect entièrement pulvérulent; cellules réduites en amas argentophiles qui parfois sont étranglées et envahies par la capsule péricellulaire hyperplasique; présence de nombreux prolongements cellulaires entièrement vacuolisés.

### Cas de Mégadolichocôlon

On a eu l'occasion d'examiner les ganglions nerveux sympathiques extirpés chirurgicalement à un enfant de 11 ans qui souffrait depuis 3 mois d'une forme de mégadolichocôlon. Ce cas nous paraît particulièrement intéressant, d'une part à cause des données qui sont ressorties de l'étude des ganglions nerveux, de l'autre parce qu'il représente le seul cas de cette maladie où les ganglions

nerveux de la chaîne sympathique lombaire ont été étudiés. Plusieurs Auteurs se sont occupés des modifications nerveuses au cours de mégacôlon, mais toutes les recherches référées dans la littérature ont porté exclusivement sur l'étude des ganglions nerveux au niveau du segment intestinal extirpé (ETZEL 1935; STÖHR 1943—1950; CAMERON, TITTEL, DELLA VALLE, ROBERTSON et KERNOHAN, TIFFIN, ZÜLZER et WILSON; STAUDACHER 1948 et d'autres). Les cellules nerveuses de la paroi intestinale présentent pour ces Auteurs des modifications progressives et régressives plus ou moins notables. HAGEN (1949) affirme avoir eu à sa disposition les ganglions nerveux sympathiques de la chaîne extirpés à un enfant de 10 ans souffrant de mégacôlon; mais cet Auteur ne dit pas un mot à propos de la morphologie de ces ganglions.

Le dossier clinique de l'enfant nous apprend que le patient n'a jamais souffert précédemment de troubles qu'on puisse mettre en relation avec la maladie en question. Depuis 3 mois seulement, et sans cause apparente, l'abdomen du garçon commença à se ballonner et au bout de 2—3 jours il devint fortement sphérique: les parois abdominales étaient sous forte tension. Pas de douleurs, mais

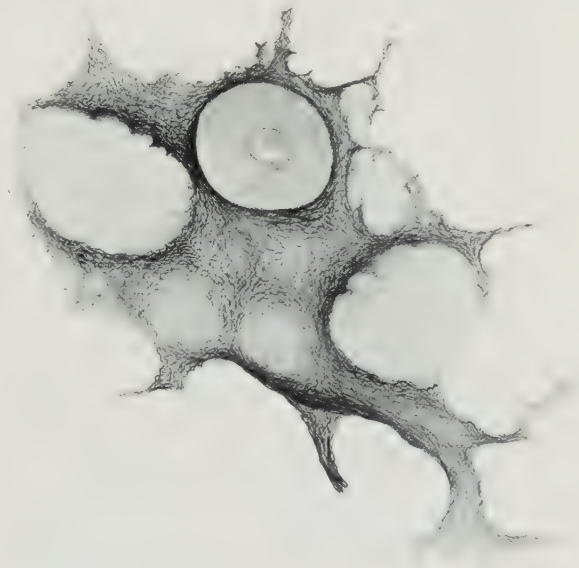


Fig. 19. Cellule nerveuse ganglionnaire cœliaque d'un sujet de 47 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger. Le cytoplasme neuronal est frappé de lésions dégénératives importantes (corrosion) qui contrastent avec le bon état de conservation du noyau. Méth. Bielschowsky-Gros

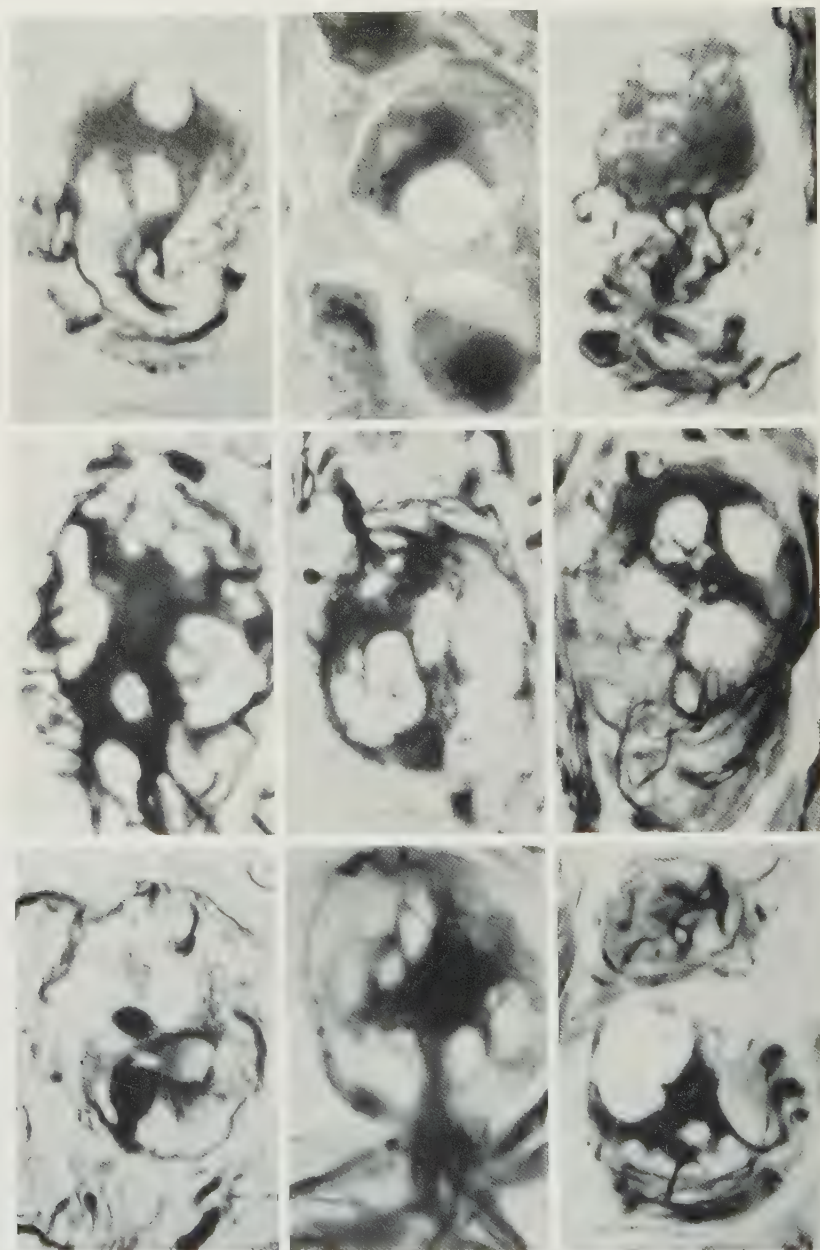


Fig. 20. Cellules nerveuses ganglionnaires appartenant à des sujets souffrant de maladies vasculaires périphériques. Les cellules sont frappées de lésions dégénératives très graves comportant de nombreuses vacuoles; dans nombre d'entre elles le noyau paraît aussi détruit. Méth. Cajal-De Castro et Bielschowsky-Gros

borborygmes intenses. En même temps se manifesta une constipation marquée et le patient n'allait à selle, avec beaucoup de peine, que tous les 3—4 jours. Les selles étaient très abondantes et fétides; l'intestin resta toujours perméable aux gaz. Cette symptomatologie dura environ un mois, puis disparut graduellement



et l'abdomen reprit son volume normal. Quinze jours avant d'entrer à l'hôpital après une rougeôle, l'abdomen recommença à se gonfler et toute la symptomatologie précédente réapparut. Une radiographie de l'appareil digestif, faite avant l'opération, a mis en évidence une dilatation énorme du gros intestin dont les anses paraissent presque fusionnées et forment une masse opaque presque uniforme. Treize jours après l'extirpation ganglionnaire le garçon sort de l'hôpital en parfait état de santé et un contrôle radiographique du gros intestin montre que les anses sont revenues à un volume plus ou moins normal.

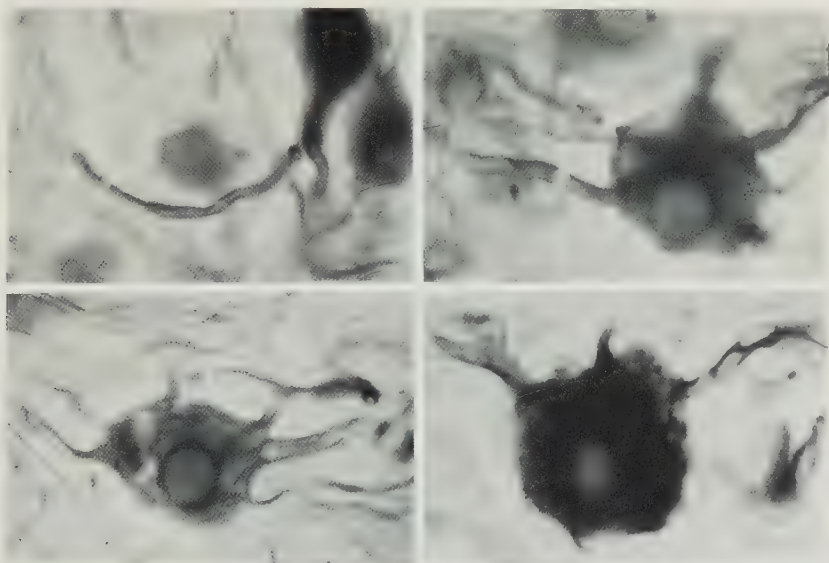


Fig. 21. Quatre cellules nerveuses coeliaques appartenant à un garçon de 11 ans souffrant de mégadolichocôlon. Les dendrites présentent l'aspect de tuyaux vides se détachant d'un pyrénophore par ailleurs normal. Dans ce cas la dégénérescence vacuolaire des prolongements nerveux n'est pas secondaire à la vacuolisation du cytoplasme neuronal, comme il arrive le plus souvent. Méth. Bielschowsky-Gros

Il a été examiné 33 coupes microscopiques du ganglion coeliaque gauche et des deux premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire. La morphologie des cellules ganglionnaires n'a rien de commun avec celle qui est propre aux enfants de cet âge. En effet, les cellules nerveuses présentent des altérations soit prolifératives, soit, surtout, régressives (Fig. 31 et 32).

Dans le ganglion coeliaque les pyrénophores atteignent le double ou même le triple du volume normal; nombre de ces éléments hypertrophiés sont aussi binucléés; certains présentent la caractéristique hyperplasie en houppe des prolongements dendritiques, nettement limitée à un pôle de la cellule. Les cellules satellites sont très nombreuses et étranglent souvent le corps cellulaire. Les phénomènes régressifs consistent notamment en: rongement périphérique du corps cellulaire, destruction des neurofibrilles, transformation du corps cellulaire en une masse homogène argentophile, transformation totale du neurone en une masse pulvérulente. Une donnée qui frappe dans presque tous les éléments de ce ganglion est représentée par la résistance bien plus grande du noyau par rapport à celle du cytoplasme. Il n'est pas rare en effet d'observer certaines



Fig. 22. Ganglion nerveux cœliaque; même sujet que la figure précédente. Des lésions dégénératives très graves frappent les neurones; cytoplasme et prolongements nerveux présentent de nombreuses vacuoles. Méth. Bielschowsky-Gros

cellules dont le noyau, enveloppé par sa membrane, est encore bien conservé tandis que le cytoplasme qui l'entoure est réduit en amas argentophile ou bien en substance pulvérulente.

Les ganglions sympathiques de la chaîne montrent dans leur ensemble des images prolifératives et régressives superposables aux images observées dans le

ganglion cœliaque. Dans certains champs microscopiques on voit, à côté d'éléments qui ont subi une différenciation modeste et qui gardent encore partiellement l'aspect de neuroblastes, d'autres cellules nerveuses hautement différenciées, hypertrophiées, dégénérées. La satellitose est partout très étendue. Parmi les prolongements cellulaires hypertrophiés on a constaté la présence d'appendices à massue terminale, dont la massue parfois assez volumineuse est plus ou moins lésée jusqu'à la vacuolisation totale.

Un autre phénomène qui nous a frappé à l'examen de tous les ganglions et qui se manifeste chez ce sujet d'une manière beaucoup plus évidente par rapport aux cas précédents, concerne le siège du noyau: dans les cellules lésées il occupe une position extrêmement périphérique et on a parfois l'impression qu'il est presque expulsé de la cellule. Déjà dans des conditions tout à fait normales, le noyau occupe dans la cellule nerveuse une position légèrement excentrique; lors des processus réactifs du pyrénophore, secondaires à une mutilation du neurite, la position excentrique du noyau s'accroît davantage. Il nous semble que dans ce cas de mégadolichocôlon la position extrêmement excentrique du noyau puisse être expliquée de la

manière suivante: dans les ganglions étudiés un grand nombre de cellules nerveuses (jusqu'à 40%) sont lésées et les altérations se traduisent souvent par la disparition de zones assez vastes de cytoplasme périphérique; par ce fait le noyau n'est plus entouré d'une couche neurofibrillaire et il donne par conséquent l'impression d'être projeté en dehors de la cellule (Fig. 30).

Une autre donnée constatée dans ce cas, avec une certaine fréquence, concerne la dégénérescence vacuolaire des prolongements cellulaires (Fig. 21). Cette altération se manifeste de manière polymorphe: dendrites présentant l'aspect de tuyaux vides se détachant d'un pyrénophore par ailleurs normal; prolongements nerveux vacuolisés se détachant de neurones rongés, corrodés, frappés de phénomènes régressifs marqués. Ces prolongements vacuolisés présentent un

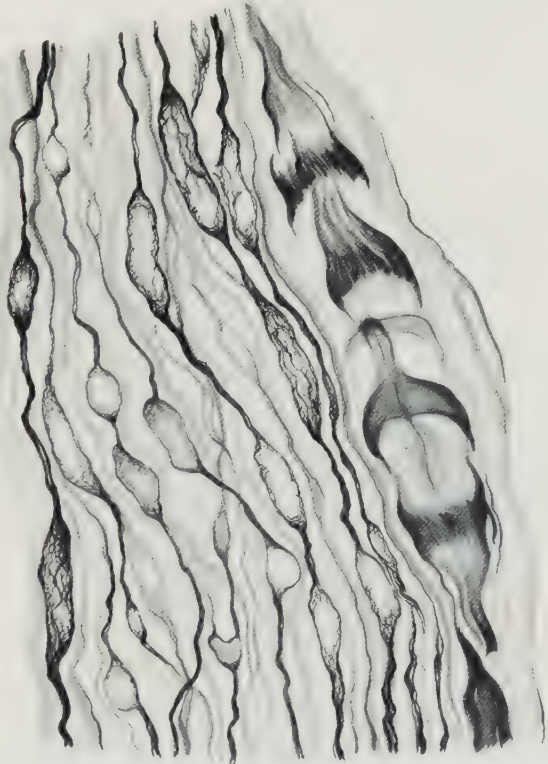


Fig. 23. Fibres nerveuses intraganglionnaires (ganglion cervical inférieur) appartenant à un sujet de 28 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger au membre supérieur. Des lésions dégénératives très graves frappent les fibres intraganglionnaires: condensation des neurofibrilles, vacuoles, fragmentation des fibres nerveuses.

Méth. Bielschowsky-Gros



volume assez important et parfois paraissent fragmentés au niveau de leur extrémité distale; dans certains cas la vacuolisation fait son apparition à ce niveau et progresse ensuite en direction centripète; ailleurs on voit des images encore plus anormales consistant en un amas central fortement argentophile ou pulvérulent entouré de toute une série de prolongements ratatinés, intensément argentophiles ou vacuolisés.

La description de ce cas de mégadolichocôlon démontre d'une manière très évidente un fait qui nous paraît fort intéressant, entre autres pour expliquer la

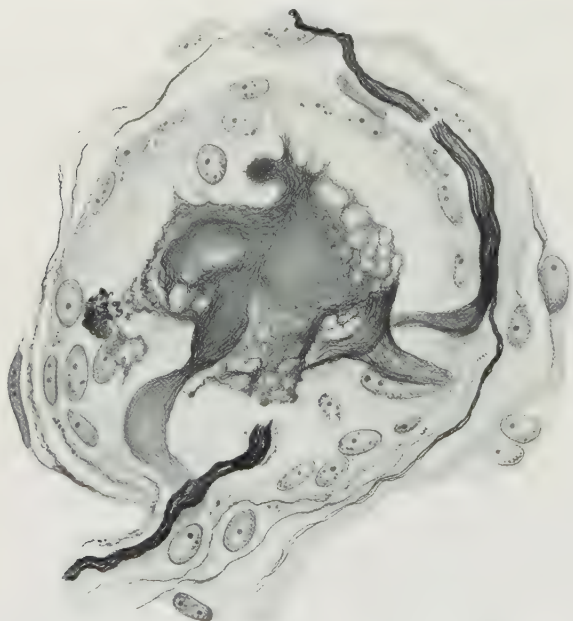


Fig. 24. Cellule nerveuse ganglionnaire lombaire appartenant à un sujet de 48 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger. La structure de la cellule est profondément bouleversée et la morphologie neuronale n'est plus reconnaissable: le réseau neurofibrillaire a entièrement disparu et la cellule est transformée en une masse argentophile assez intensément imprégnée. Méth. Bielschowsky-Gros

pathogenèse de cette maladie: les modifications remarquables progressives et régressives des cellules nerveuses des ganglions cœliaque et lombaires sont indiscutablement beaucoup plus marquées et plus graves que les modifications neuronales décrites par tous les Auteurs précédents au niveau des cellules nerveuses intramurales intestinales. Cette donnée souligne l'importance primaire du composant nerveux dans le déterminisme de la maladie de Hirschsprung et se rattache par conséquent à la théorie neurogène qui est aujourd'hui la plus accréditée et qui repose, entre autres, sur les résultats expérimentaux et aussi sur les effets de la thérapie. Mais les Auteurs précédents qui se sont occupés de cette

question ont basé la théorie neurogène seulement sur le comportement du système nerveux autonome intestinal. Par contre le cas qu'on vient d'exposer accentue davantage l'importance du composant nerveux proximal, c'est-à-dire des ganglions nerveux étudiés. Du reste c'est de ces ganglions que partent les fibres nerveuses postganglionnaires se portant à la musculature intestinale.

## Considérations

### 1. Considérations d'ordre technique

Différentes techniques sont employées pour l'étude microscopique du système nerveux central et périphérique: la méthode de NISSL qui met en évidence la substance tigroïde, les méthodes de WEIGERT et de MARCHI qui servent notamment pour l'étude des faisceaux nerveux, et toute la série des imprégnations

métalliques à l'argent. Il est évident que l'association et la réalisation de toutes ces méthodes sur le même matériel qui forme l'objet d'une étude, représente la condition idéale pour déceler la morphologie neuronale de la manière la plus complète. Mais la réalisation pratique de toutes ces méthodes sur le même matériel n'est pas toujours aisée, surtout à cause de la somme de travail nécessaire; c'est pourquoi on finit par choisir d'habitude l'une ou l'autre d'entre elles. Un motif qui joue sans doute un rôle important dans ce choix est représenté par la préférence individuelle du chercheur; en effet, chaque histologiste travaillant depuis un certain temps sur le

système nerveux, finit par se familiariser avec une ou deux de ces méthodes dans lesquelles il se perfectionne et dont il devient peu à peu maître. En restant par exemple dans le domaine des imprégnations argentiques, certains neurohistologistes donnent la préférence aux solutions de nitrate d'argent (méthode de CAJAL et ses variantes), d'autres utilisent un complexe ammoniac-argentique (méthode de BIELSCHOWSKY et ses variantes), ou bien le carbonate d'argent ammoniacal (DEL RIO HORTEGA), d'autres encore préfèrent les méthodes utilisant les protéinates d'argent (méthode de BODIAN), et d'autres chercheurs enfin choisissent les méthodes utilisant un complexe tannin-argent

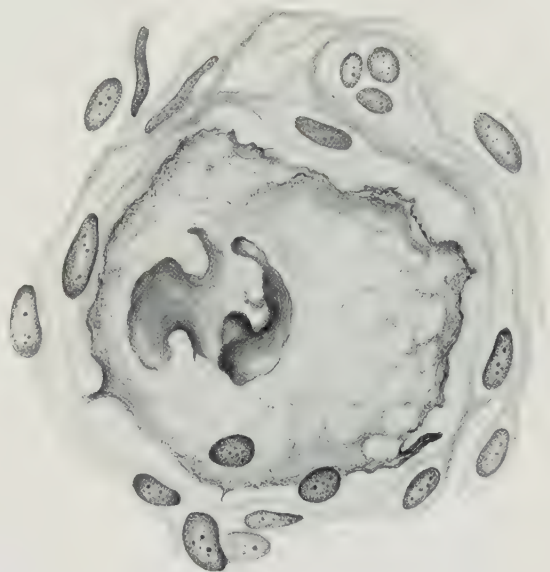


Fig. 25. Cellule nerveuse ganglionnaire cœliaque appartenant à un sujet de 54 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger. Toute morphologie neuronale a entièrement disparu: le neurone est réduit à un amas plus ou moins homogène au sein duquel on constate des blocs argentophiles qui représentent les vestiges du noyau. Des cellules satellites entourent les restes du neurone. Méth. Bielschowsky-Gros

(technique de ACHUCARRO et DEL RIO HORTEGA). En principe ces techniques ne sont pas superposables en ce qui concerne les résultats qu'on peut en tirer: à savoir certaines d'entre elles mettent mieux en évidence la morphologie d'ensemble du neurone, d'autres sont particulièrement aptes pour son étude cyto-  
logique, d'autres enfin font ressortir davantage les neurofibrilles. Toutefois une seule de ces méthodes, dans les mains d'un chercheur expérimenté, peut donner des résultats assez satisfaisants pour l'étude des différents composants morphologiques du neurone.

On a employé pour cette étude la méthode de CAJAL-DE CASTRO au nitrate d'argent et surtout la méthode de BIELSCHOWSKY-GROS; ces deux méthodes, que nous avons toujours utilisées pour nos recherches dans le domaine du système nerveux, nous ont donné constamment de bons résultats et nous y sommes particulièrement attachés. D'après notre expérience nous considérons ces deux méthodes complémentaires l'une de l'autre, car chacune met mieux en évidence

des composants différents du neurone. La méthode de CAJAL-DE CASTRO est particulièrement intéressante pour la détection du pigment qui est intensément coloré en noir et se présente sous forme de grains se détachant nettement sur le fond jaunâtre du cytoplasme; on arrive très bien à en préciser la topographie, la quantité, les caractères morphologiques. Par la méthode de BIELSCHOWSKY les mêmes granulations de pigment ne sont pas toujours bien visibles, souvent

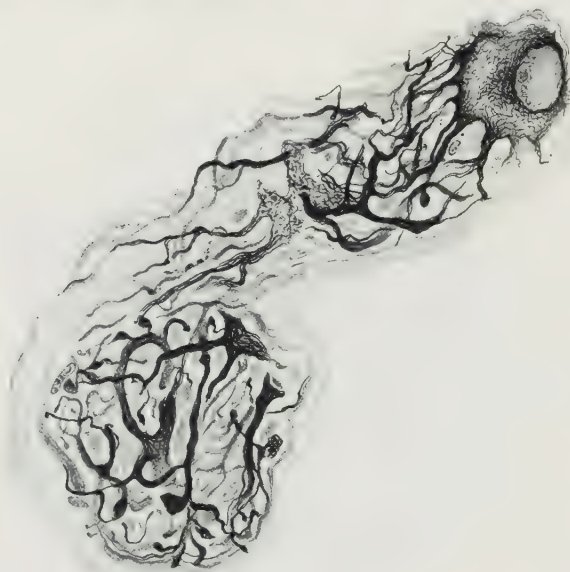


Fig. 26. Cellules ganglionnaires lombaires appartenant au même sujet que précédemment. La cellule d'en haut est frappée en même temps de phénomènes prolifératifs et dégénératifs. La cellule d'en bas est réduite à des amas et à des prolongements argentophiles s'entrelaçant d'une manière luxuriante en délimitant des fentes où siègent de nombreuses cellules satellites. Méth.

Bielschowsky-Gros

elles sont entièrement masquées par les neurofibrilles. La méthode de CAJAL est encore intéressante pour la mise en évidence de la capsule péricellulaire avec tous ses composants (cellulaire et fibrillaire); par contre par la méthode de BIELSCHOWSKY on arrive à détecter la capsule seulement lorsqu'elle est particulièrement hypertrophiée et ses cellules hyperplasiées. Enfin la méthode de CAJAL se prête bien pour l'étude cytotogique du pyrénophore (noyau, nucléole, neurofibrilles). La méthode de BIELSCHOWSKY-GROS donne une image assez

complète quant au nombre,

au volume et à la distribu-

tion des prolongements cel-

lulaires; nous avons aussi

constaté que les phénomè-

nes régressifs frappant le neurone (vacuolisation, homogénéisation, amas argentophiles, amas pulvérulents), sont mieux mis en évidence par cette dernière méthode.

Comme on l'a déjà fait remarquer plus haut, la morphologie des ganglions nerveux au cours d'une même maladie a été décrite d'une manière non seulement différente mais parfois même opposée par les divers Auteurs. Cela tient entre autres au fait que les techniques utilisées n'ont pas toujours été les mêmes et que chacune d'entre elles a mis en évidence des particularités différentes. De plus il faut toujours avoir présent à l'esprit que chacune des méthodes à l'argent est très capricieuse dans sa réalisation. Ainsi par exemple il est notoire qu'en observant au microscope plusieurs coupes qui ont été imprégnées en même temps et par une technique rigoureusement la même, on ne trouve pas une coupe tout à fait pareille à l'autre: dans l'une par exemple les neurones ressortent bien, dans l'autre ils sont faiblement imprégnés, dans une troisième ils peuvent rester complètement incolores. En outre, même en observant les cellules nerveuses placées dans le même champ microscopique, on constate parfois qu'elles ne sont



pas toutes imprégnées d'une manière identique. Les imprégnations argentiques mal réussies sont souvent la cause d'interprétations fausses, et par conséquent elles représentent la source de bien des erreurs: par exemple des neurones présentant un contour flou, parfois ratatiné, la surface corrodée, sont des images qui militent en faveur d'un état pathologique neuronal; mais dans certains cas ces images représentent simplement des artefacts liés à l'imperfection de la technique. Pour démêler le vrai d'avec le faux il sera utile, entre autres, d'étudier comparative-ment un nombre assez important de coupes du même ganglion nerveux. Tout ce qu'on vient de dire souligne d'une manière incontestable le fait suivant: dans toute étude neuro-histologique il faut être extrêmement prudent avant de formuler un jugement définitif.

Nous n'avons pas exécuté sur notre matériel la méthode de NISSL pour mettre en évidence la substance tigroïde, bien que cette méthode soit largement employée par les pathologistes pour l'étude du tissu nerveux. La substance tigroïde, qui se colore normalement par des colorants basiques, et se présente en général sous forme de grumeaux, n'est pas un composant morphologique constant dans toutes les cellules nerveuses. En effet, elle existe en quantité proportionnelle au volume de la cellule: elle est abondante dans les grandes cellules nerveuses, tandis qu'elle est absente ou rare dans les cellules nerveuses les plus petites (par exemple chez les gastéropodes elle fait entièrement défaut). Même dans les

cellules nerveuses des vertébrés les granulations de NISSL sont réparties dans le cytoplasme de façon variable: là, par exemple où les neurofibrilles se réunissent pour se continuer dans le neurite, ainsi que tout le long de ce dernier ou bien dans les travées nerveuses de la zone fenêtrée ou dans les massues terminales, cette substance fait défaut; elle manque enfin dans la partie la plus distale des dendrites. En se basant entre autres sur sa topographie inconstante et variable, les biologistes pensent que la présence de la substance de NISSL ne soit pas essentielle pour la fonction du neurone. Les méthodes qui la mettent en évidence ont encore démontré la labilité de cette substance qui, dans les conditions



Fig. 27. Cellule nerveuse ganglionnaire (ganglion cervical inférieur) appartenant à un sujet de 28 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger. Le neurone est frappé simultanément de phénomènes prolifératifs et dégénératifs qui lui confèrent une morphologie très compliquée.

Méth. Bielschowsky-Gros

les plus diverses, peut facilement disparaître pour se reconstituer ensuite; les expériences sur la régénération des nerfs ont confirmé le caractère labile de ce composant. Les observations sur les cellules nerveuses cultivées *in vitro* ont

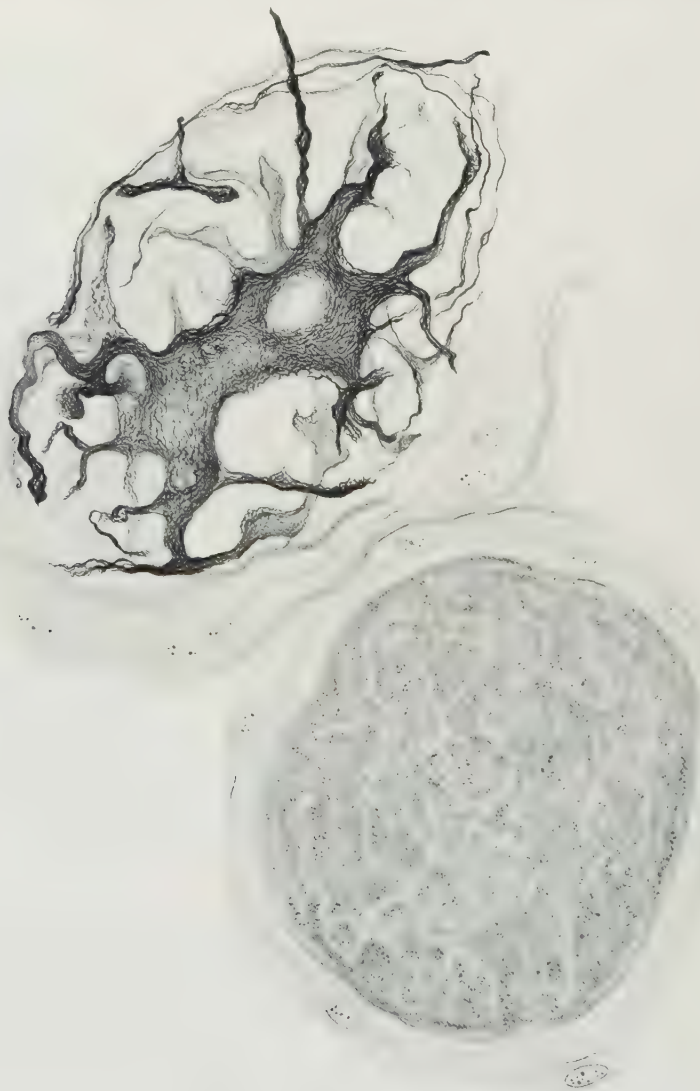


Fig. 28. Même cas que la figure précédente. Le protoplasme neuronal de la cellule d'en haut est fortement corrodé; les dendrites hypertrophiés s'anastomosent par places en formant des fenêtres péricellulaires. Le neurone d'en bas est totalement détruit et transformé en un amas pulvérulent au sein duquel aucun composant neuronal n'est plus reconnaissable («pulvérisation» neuronale). Méth. Bielschowsky-Gros

confirmé, d'une part la présence réelle de la substance trigoïde dans le neurone vivant, de l'autre sa grande sensibilité aux actions mécaniques: en effet, une microponction portée par l'aiguille du micromanipulateur désagrège immédiatement la substance de NISSL, tandis que les neurofibrilles n'en souffrent pas.

En nous basant sur toutes ces données qui concordent sur les caractères de variabilité, d'inconstance, de faible résistance de la substance de NISSL, nous avons laissé de côté cette méthode en portant notre choix exclusivement sur les méthodes argentiques: en effet, celles-ci sont non seulement aptes à révéler complètement la morphologie neuronale, mais elles sont aussi les plus adéquates pour en mettre en évidence le composant fondamental, c'est à dire les neurofibrilles.

## 2. «Individualité» dans la morphologie ganglionnaire

L'une des causes qui rendent parfois difficile l'interprétation et la lecture des coupes microscopiques de tissu nerveux, et qui explique d'ailleurs la description

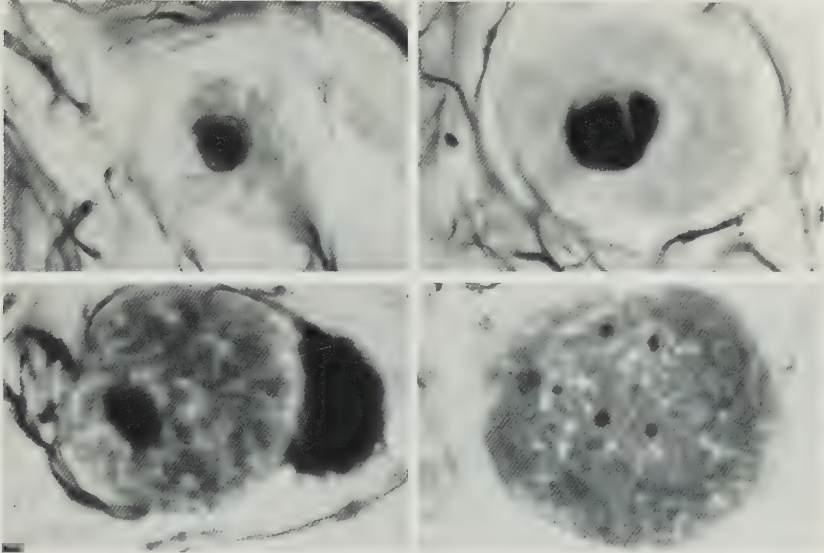


Fig. 29. Quatre neurones entièrement détruits au sein du ganglion cervical inférieur (cas 17) d'un sujet atteint d'une forme grave de maladie de Bürger. Les neurones sont transformés en une masse pulvérulente renfermant des granulations ou des boules intensément noires qui représentent les vestiges du noyau. Méth. Bielschowsky-Gros

différente que deux Auteurs peuvent faire d'une même préparation, est représentée avant tout par l'individualité propre aux différentes cellules d'un même ganglion et par l'individualité d'un ganglion déterminé vis-à-vis des autres. Différents Auteurs ont déjà attiré l'attention sur ce fait; les données qui ressortent de cette étude confirment ce concept d'«individualité». En effet, si l'on prend en considération les cellules nerveuses appartenant à un même ganglion, on peut affirmer que presque chaque neurone est caractérisé par une morphologie particulière se traduisant d'une part par l'aspect du pyrénophore, de l'autre par la morphologie de ses prolongements; en comparant minutieusement les différentes cellules nerveuses visibles dans un seul champ microscopique, on peut presque affirmer qu'il n'y a pas un neurone pareil à tout point de vue à un autre. Certains Auteurs ont essayé d'approfondir dans les détails le concept d'individualité et de variabilité cellulaire. BOTAR (1956) par exemple s'est attaché à la variabilité cellulaire du ganglion coeliaque et a encadré dans des schémas les différentes formes cellulaires caractérisant ce ganglion: chez des individus jeunes



BOTAR (1956) a divisé les cellules ganglionnaires en différents types d'après l'aspect et le caractère juvénile ou sénéscent que présentent les cellules.



Fig. 30. Ganglion nerveux cœliaque appartenant à un sujet de 11 ans souffrant de mégadolichocôlon. La presque totalité des neurones sont atteints de lésions dégénératives intenses; certains d'entre eux paraissent entièrement détruits. Dans d'autres neurones la destruction et la disparition du cytoplasme périphérique aboutit aux images de «noyau expulsé». Méth. Bielschowsky-Gros

Au cours de cette recherche nous avons étudié de nombreux ganglions nerveux: le ganglion cervical inférieur, le premier ganglion thoracique, le ganglion stellaire, les 2—3 premiers ganglions lombaires de la chaîne sympathique latéro-vertébrale, le ganglion cœliaque; mais nous n'avons pas porté une attention particulière aux différences éventuelles qui caractérisent la morphologie d'un ganglion par rapport à un autre. Toutefois on a été frappé par la grande sensibilité des cellules du ganglion cervical inférieur; ces cellules se révèlent en effet extrêmement plus sensibles par rapport aux cellules des autres ganglions, si elles sont soumises aux mêmes stimuli anormaux, et présentent des modifications progressives ou dégénératives indiscutablement plus notables. Cette sensibilité accusée du ganglion cervical inférieur marque donc son individualité vis-à-vis des autres ganglions.

D'ailleurs ces observations sur du matériel pathologique (ganglion nerveux au cours de maladie vasculaire périphérique) concordent avec d'anciennes observations faites sur des ganglions sympathiques tout à fait normaux. Dans son *Traité d'Histologie* LEVI (1954) affirme que les transformations qui se passent dans les cellules du ganglion cervical supérieur de l'homme, au cours de la sénescence physiologique,

sont sensiblement plus marquées par rapport aux modifications qui se passent dans les cellules des autres ganglions de la chaîne sympathique latéro-vertébrale. LEVI (1954) pense que ce comportement particulier représente un caractère qui marque l'individualité de ce ganglion vis-à-vis des autres. Toutefois il y a

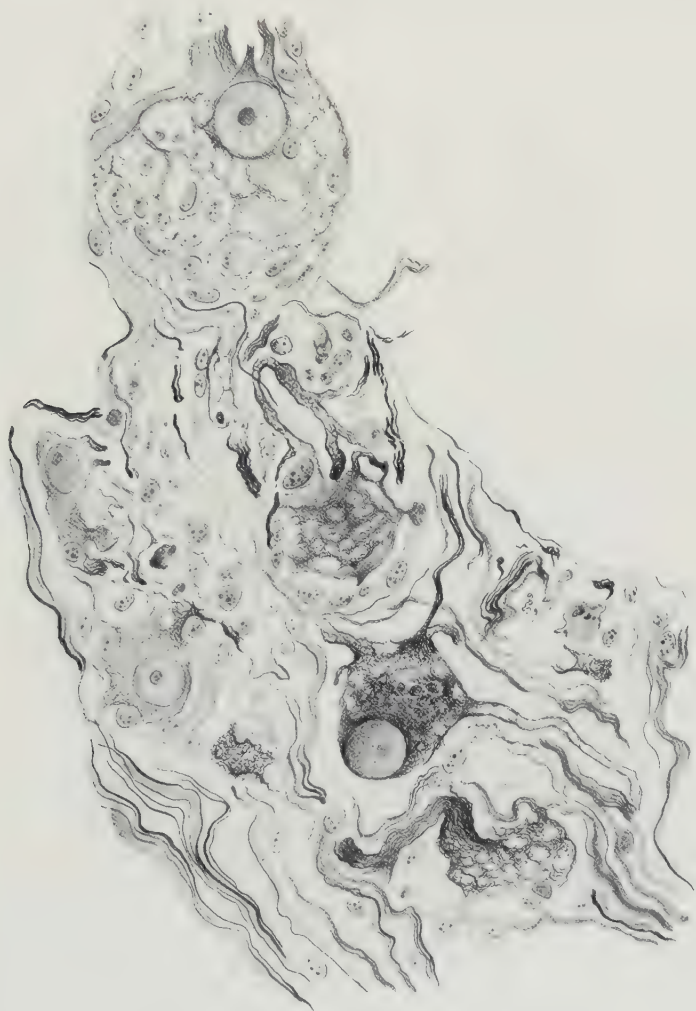


Fig. 31. Même cas que la figure précédente. Nombre de neurones sont en proie à des lésions dégénératives importantes; d'autres sont entièrement détruits et représentés par des restes faiblement argentophiles. Le gros neurone d'en haut est entièrement envahi par les cellules satellites qui résorbent le protoplasme neuronal; à remarquer dans ce neurone l'état de conservation, encore relativement bon, du noyau. Méth. Bielschowsky-Gros

un autre facteur dont il faut toujours tenir compte et qui joue sans doute un rôle important dans le déterminisme de la morphologie cellulaire et ganglionnaire: c'est l'individualité du sujet auquel le ganglion appartient. A propos du même ganglion cervical supérieur par exemple, TERNI (1935) a observé dans de rares cas un comportement exactement contraire au comportement retenu le plus fréquent: cet Auteur a constaté dans quelques cas que les cellules du gan-

glion cervical supérieur âgé ou très âgé peuvent présenter un aspect et des caractères absolument juvéniles.

Enfin pour rendre encore plus difficile l'interprétation des coupes microscopiques du système nerveux, s'ajoute l'individualité de jugement du chercheur.

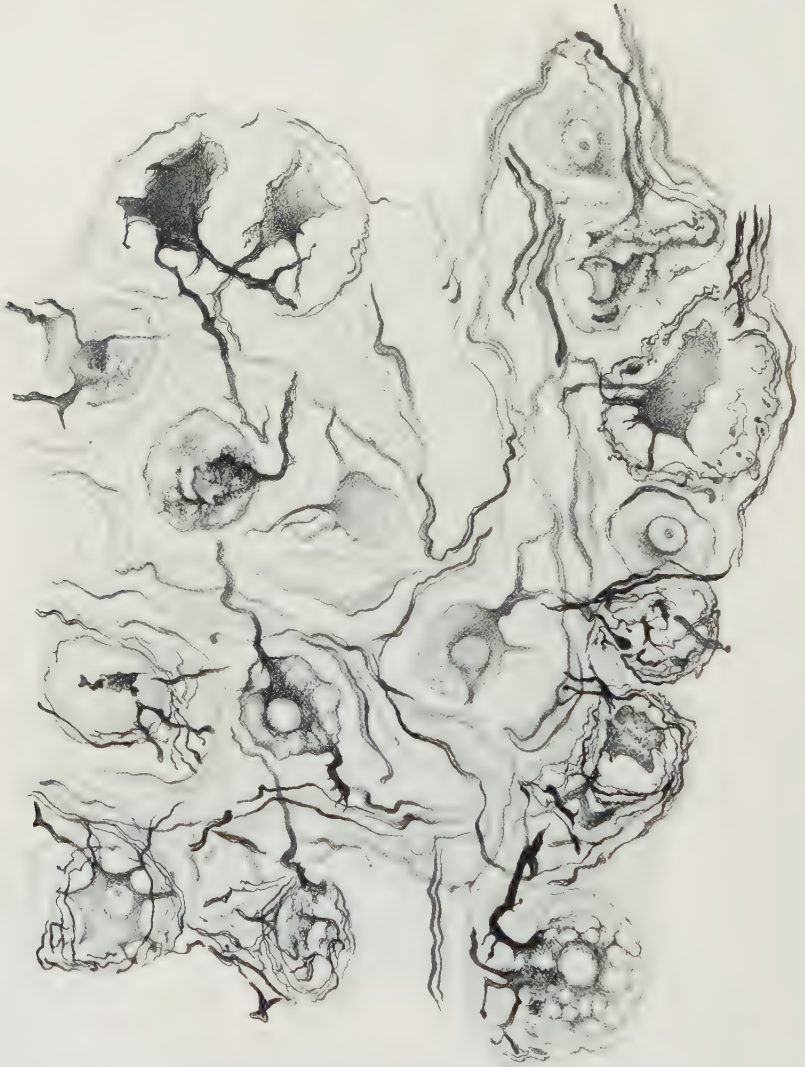


Fig. 32. Ganglion nerveux cervical inférieur appartenant à un sujet de 28 ans souffrant d'une forme grave de maladie de Bürger. Les lésions ganglionnaires vont de pair avec la gravité clinique de la maladie. On peut constater dans les différents neurones toute la gamme des lésions dégénératives: vacuolisation cytoplasmique, fragmentation du protoplasme, pulvérisation, destruction du noyau.

Méth. Bielschowsky-Gros

Nous en donnons un exemple: BOTAR (1956) affirme, dans son travail sur la morphologie cellulaire du ganglion coeliaque, que le 13% des cellules observées chez des individus normaux présentent des signes de régression et il en apporte les images. A notre avis par contre, non toutes les cellules admises par BOTAR



(1956) comme «dégénérées» doivent être considérées comme telles; en effet, lors de nos recherches, nous avons toujours considéré de tels éléments comme porteurs de lésions initiales et par conséquent non irrémédiablement dégénérés.

Tous ces exemples d'individualité cellulaire, ganglionnaire, du sujet auquel le ganglion appartient et enfin de l'interprétation du chercheur ne militent pas en faveur d'un schématisme dans le domaine de la morphologie neuronale et conseillent une certaine prudence avant de formuler des jugements définitifs.

### 3. Caractères généraux des modifications ganglionnaires

Le trait essentiel qui caractérise la morphologie des cellules nerveuses au cours des différentes maladies que nous avons eu l'occasion d'étudier est représenté par la non-spécificité des modifications ganglionnaires; c'est-à-dire on n'a pas observé d'images pathologiques typiques pour une maladie donnée. Au cours de toutes les maladies étudiées on a constamment observé des modifications ganglionnaires se traduisant par des images progressives ou régressives; ce qui varie n'est seulement que le degré de ces modifications et surtout le nombre d'éléments nerveux qui en sont atteints. Le degré des modifications et le nombre de cellules nerveuses lésées sont en rapport étroit avec la gravité clinique de la maladie et par conséquent avec la qualité et l'intensité des stimuli se portant sur les neurones.

Cela nous amène à considérer de plus près la modalité selon laquelle la cellule nerveuse répond en toute circonstance aux différentes stimulations se portant sur son protoplasme. Le comportement du neurone, vis-à-vis des stimuli, dans les conditions normales et pathologiques, est bien différent du comportement de la presque totalité des cellules des autres tissus, et cela tient au fait que la cellule nerveuse est un élément définitif ne pouvant pas se multiplier. Sa différenciation morphologique est assez précoce et commence à se réaliser, pour nombre d'éléments, déjà au cours de la vie fœtale; si à un moment donné de la vie pré- ou post-natale le neurone est atteint par des phénomènes destructifs, il disparaît et ne peut plus être remplacé. Les stimuli se portant sur le neurone au cours de toute la vie sont très nombreux; l'activité de la cellule nerveuse consiste à répondre à ces stimuli et la somme de travail que cela comporte est matérialisée par les modifications morphologiques que le neurone subit au cours de la sénescence physiologique. Dans des conditions normales le neurone travaille «à l'épargne», c'est-à-dire qu'il réalise des modifications notables de manière très lente et graduelle, de façon à économiser le plus possible les réserves morpho-génétiques dont il dispose. Aucun autre élément cellulaire ne présente au cours de la vie des transformations aussi marquées: pour les éléments labiles, dont la durée de vie est courte ou très courte, les modifications de la forme sont à peine accusées ou même inexistantes. Les modifications des neurones, au cours de la sénescence physiologique, ont été largement étudiées dans les différentes régions du système nerveux central et périphérique; personnellement nous nous sommes occupés des neurones intracardiaques, intrapulmonaires, intraappendiculaires. On peut dire que dans l'ensemble les transformations des neurones se passent à peu près de la même manière, c'est-à-dire qu'elles obéissent à des règles générales valables, à de rares exceptions près, dans tous les districts; seul le degré des transformations peut varier.

La morphologie des cellules nerveuses ganglionnaires dans certaines conditions pathologiques est étroitement dépendante de la nature et de l'intensité du stimulus anormal se portant sur le protoplasme neuronal. Si les stimuli sont modestes, les modifications ne sont pas très différentes par rapport à celles qui se passent au cours de la sénescence physiologique; ces transformations sont seulement concentrées dans le temps et peuvent se manifester même en âge juvénile, où elles ne sont jamais observées lors de conditions normales. Si l'intensité des stimuli devient plus importante, la morphologie cellulaire est caractérisée non seulement par des modifications progressives mais surtout par des modifications régressives qui ne s'observent jamais au cours de la sénescence physiologique; ces modifications régressives sont nettement de nature pathologique et peuvent compromettre de façon définitive la vitalité du neurone. Si les stimuli pathologiques sont d'emblée très intenses et violents, les lésions neuronales sont constituées en prédominance par des images régressives.

Au cours de cette recherche nous avons constaté que la durée de la stimulation, se traduisant par la durée de la maladie, n'influence pas d'une manière notable les modifications cellulaires; c'est toujours l'intensité de la stimulation qui joue le rôle primordial.

Sur la base de ce que nous venons de dire on voit l'inutilité de tant de discussions entre différents Auteurs, dont certains affirment que les ganglions nerveux au cours de maladies vasculaires périphériques sont caractérisés par des phénomènes progressifs, tandis que d'autres ont constaté la prédominance de phénomènes régressifs; l'on avait même divisé l'histopathologie de la maladie de Bürger en se basant sur l'une ou l'autre de ces manifestations morphologiques neuronales. Les données qui découlent de nos observations mettent en évidence que les maladies vasculaires périphériques, comme d'ailleurs les autres maladies dont nous nous sommes occupés, sont caractérisées par une morphologie variable dépendant du degré des stimuli. Cette morphologie peut être schématisée de la manière suivante:

— stimuli modestes = modifications ganglionnaires à morphologie proliférative;

— stimuli plus accusés = modifications ganglionnaires à prédominance proliférative, mais comportant aussi des phénomènes dégénératifs;

— stimuli encore plus marqués ou violents = modifications ganglionnaires à prédominance dégénérative, mais comportant aussi des phénomènes prolifératifs.

Dans les pages qui suivent on va illustrer les modifications ganglionnaires en les divisant en phénomènes prolifératifs et lésions dégénératives. Cette division ne doit pas faire oublier que les deux types de modifications sont bien souvent associées dans le même ganglion, dans les cellules visibles sur le même champ microscopique, souvent dans le même neurone.

#### 4. Modifications ganglionnaires de nature proliférative

##### *a) Hypertrophie et hyperplasie neuronale*

Quand des stimuli anormaux se portent sur le protoplasme neuronal, celui-ci y répond selon la modalité qui lui est habituelle: en premier lieu le pyrénophore augmente de volume, puis le volume et le nombre également des dendrites deviennent plus importants. Nous assistons là à une première tentative de la part de la

cellule de se mettre dans les conditions les plus adéquates à faire face au surcroît de travail qui lui est demandé: elle le fait en augmentant sa surface. Si les stimuli ne cessent pas, il arrive un moment où l'augmentation volumétrique de la cellule ne peut plus se poursuivre, puisqu'une disproportion trop importante du rapport nucléo-plasmique compromettrait la vitalité de la cellule. Mais les neurones possèdent d'autres réserves intrinsèques morpho-génétiques qui leur permettent de s'adapter aux nécessités fonctionnelles toujours croissantes et d'augmenter ultérieurement leur surface, tout en gardant le rapport volumétrique nucléo-plasmique dans des limites compatibles avec la vie cellulaire; cette capacité ultérieure d'adaptation du neurone se matérialise par l'apparition de formations paraphytaires. Les prolongements dendritiques, déjà assez nombreux et volumineux, s'entortillent à plusieurs reprises autour du pyrénophore en formant des pelotons assez compliqués. Une image de réaction proliférative assez marquée et typique qu'on a constatée avec une certaine fréquence consiste en hypertrophie et hyperplasie des prolongements dendritiques se développant à un pôle de la cellule et se dirigeant dans une seule direction où ils constituent des buissons compliqués. En voyant au microscope des images de ce genre on a presque l'impression qu'il existe un tropisme particulier des prolongements. Parfois la brousaille dendritique d'une cellule reste isolée et indépendante des autres cellules (Fig. 2 et 3); dans d'autres cas les buissons dendritiques, encore plus compliqués, sont formés par les prolongements de deux ou trois neurones qui s'entortillent et s'entrecroisent d'une façon telle qu'on ne réussit plus à distinguer à quelle cellule appartiennent les différents prolongements (Fig. 3). Parfois la complication des dendrites aboutit à la formation de fenêtres péricellulaires: la périphérie de la cellule présente un aspect en nid d'abeilles et les extrémités cytoplasmiques de ces fenêtres s'articulent ou directement à la surface du pyrénophore, ou à la surface d'autres fenêtres plus profondes. Il y a enfin une autre image morphologique qui traduit d'une manière assez singulière la tendance de la cellule à s'accroître: certains dendrites, ou bien des appendices cellulaires néoformés, s'hypertrophient notablement et se terminent à leur extrémité libre par une boule neurofibrillaire d'aspect plus ou moins régulier (voir p. 530 et suivantes).

Toutes les images décrites ci-dessus ont été fréquemment observées dans nombre de nos préparations, notamment chez les individus dont la symptomatologie clinique atteignait un certain degré de gravité.

Les images prolifératives en elles-mêmes ne revêtent pas de caractère pathologique et sont seulement l'expression d'une morphologie neuronale assez ou très compliquée. Des images neuronales assez compliquées peuvent être observées parfois dans des conditions tout à fait normales, mais seulement à partir d'un âge relativement avancé: ce sont justement ces images prolifératives qui caractérisent, au cours de la sénescence physiologique, l'âge avancé du ganglion. Mais si les mêmes images se voient à un âge précoce, en nombre important et avec une complication assez notable, elles témoignent alors d'un caractère réactionnel, c'est-à-dire d'un état pathologique du ganglion. En résumé, seul l'âge du patient d'une part, la quantité et la qualité des images prolifératives de l'autre, indiquent la signification normale ou pathologique qu'on doit attribuer à ces formations.

Toujours dans le domaine des phénomènes prolifératifs neuronaux, il y a lieu de dire un mot à propos d'une image observée dans quelques cas et qui d'ailleurs



représente une donnée fort peu connue: il s'agit de la continuité matérielle entre les dendrites de deux ou plusieurs cellules nerveuses (Fig. 3). Il s'agit là évidemment d'un phénomène de nature pathologique. La connection directe des cellules nerveuses par des ponts protoplasmiques anastomotiques représente, chez les invertébrés, une donnée fréquente d'ordre tout à fait normal. BETHE affirme que chez les méduses, les actinies et les cténophores le système nerveux présente une organisation très simple et que les cellules nerveuses sont anastomosées entre elles par des ponts plasmatiques intercellulaires, au sein desquels les neurofibrilles passent d'une cellule à l'autre. Selon ASCOLI les cellules nerveuses du système végétatif chez les hirudinées sont réunies entre elles de la même manière. Chez les insectes et les planaires BELA HALLER et MONTI ont observé les mêmes phénomènes. Chez les vertébrés par contre les choses se passent différemment. Les nombreuses recherches faites dans ce domaine ont confirmé l'individualité anatomique et fonctionnelle du neurone. L'existence d'anastomoses entre les dendrites de deux cellules différentes a été constatée seulement dans des cas exceptionnels; ces observations portent notamment sur les cellules du système sympathique (KÖLLIKER, MICHAÏLOW, RIQUEUR).

Le fait qu'au cours des artérites périphériques certains neurones perdent leur individualité et s'anastomosent avec les prolongements de neurones contigus témoigne d'un état particulier de nature pathologique frappant la cellule nerveuse.

#### *b) Appendices à boule terminale et boutons terminaux*

Lors de cette étude on a observé certaines images dont l'interprétation a toujours été controversée par les différents Auteurs qui s'en sont occupés; il s'agit de ces appendices cellulaires pourvus d'un gonflement terminal, appendices indiqués par les Auteurs allemands sous le nom de «Kugelpänomene». Par ce nom on indique une boule, plus ou moins volumineuse et à structure neurofibrillaire, se trouvant à l'extrémité d'un prolongement nerveux constitué, lui aussi, par des neurofibrilles. La confusion qui règne à propos de ces formations dépend en partie du fait que leur genèse et leur signification ne sont pas toujours les mêmes. En étudiant les différentes formations nerveuses pourvues de boules terminales nous avons pu les classer dans les quatre ordres suivants:

α) Il existe des dendrites qui se terminent à leur extrémité distale par un gonflement de volume ordinairement peu important. Les dendrites pourvus de ces boules représentent, à partir d'un âge avancé, une image normale pour certains neurones du système nerveux végétatif intramural (par exemple ceux des ganglions nerveux intracardiaques, Fig. 5); le nombre de ces formations augmente très lentement et graduellement au cours de l'âge. Leur présence n'a donc pas une signification pathologique, à moins que leur nombre ne soit considérable et qu'elles ne fassent leur apparition à un âge juvénile, quand les mêmes formations n'existent pas normalement.

Dans de rares cas seulement on a eu l'occasion de constater des dendrites pourvus de massue terminale dans les ganglions objet de cette étude. Puisque ces formations n'existent pas normalement dans les ganglions nerveux de la chaîne latéro-vertébrale, il va de soi que leur présence revêt une signification nettement pathologique et témoigne d'un état réactionnel prolifératif du neurone;

en effet, les neurones comportant ces formations présentaient aussi d'autres phénomènes prolifératifs.

$\beta$ ) Une deuxième variété d'appendices à massue terminale existe parfois dans des cellules caractérisées par des phénomènes prolifératifs très intenses, mais leur genèse est différente de celle des formations décrites sous  $\alpha$ : il s'agit d'appendices cytoplasmiques néoformés dont la morphologie rappelle de près les pseudopodes des cellules mobiles (Fig. 7). Ces appendices font leur apparition lorsque la cellule est soumise à des stimuli importants; ils se terminent à l'extrémité par une partie neurofibrillaire gonflée, ayant une forme ovoïde, parfois étoilée, parfois encore pyriforme.

Au cours de cette étude on a constaté de telles images (Fig. 8) chez des sujets dont les cellules ganglionnaires étaient en proie à des phénomènes prolifératifs très marqués. La signification de ces formations dans les ganglions de la chaîne est donc toujours d'ordre pathologique et leur présence témoigne d'un état d'hyperactivité intense de la cellule nerveuse.

Les formations décrites sous  $\alpha$  et sous  $\beta$  sont, en règle générale, faciles à reconnaître et à identifier au microscope: en effet, d'une part elles siègent dans le voisinage immédiat de la cellule, de l'autre il est assez aisé de les suivre tout le long de leur parcours et de constater par conséquent la continuité matérielle entre le cytoplasme de la cellule nerveuse et le dendrite ou l'appendice néoformé avec sa boule terminale.

$\gamma$ ) Un troisième type d'appendices neurofibrillaires pourvus de massue terminale est représenté par les fibres nerveuses se terminant à leur extrémité par des boutons qui s'articulent en synapse à un autre neurone (synapse à boutons terminaux). Ces synapses représentent une modalité d'articulation interneuronale tout à fait normale au niveau du système nerveux central. Par contre dans les ganglions de la chaîne sympathique latéro-vertébrale elles sont très rares et, comme LEVI l'affirme, ici elles se réalisent toujours «par contact parallèle», sans boutons terminaux; la synapse se réalise donc entre les ramifications amincies d'une fibre nerveuse et les dendrites et le pyrénophore d'une autre cellule nerveuse. Toutefois il est possible que, lorsque ces ganglions sympathiques sont soumis à des stimuli et à des irritations pathologiques, les fibres nerveuses intraganglionnaires les ressentent également et que leur réaction se traduise par l'émission de boutons terminaux à l'extrémité distale: par conséquent leur présence témoigne d'un état de souffrance neuronale. Dans le matériel de cette étude on a eu parfois l'occasion d'observer des formations de ce genre (Fig. 9).

$\delta$ ) Enfin un dernier type d'appendices neurofibrillaires à massue terminale se réalise dans les neurites après leur mutilation; ce type est plutôt rare. Les incisions expérimentales ont mis en évidence que la partie centrale d'une fibre sectionnée est capable de régénération. Celle-ci se déroule alors entre autres par l'émission de prolongements neurofibrillaires en boutons ou en pinceaux. Cette modalité de croissance des fibres sectionnées correspond d'ailleurs à la croissance des neurites au cours de leur développement embryonnaire, comme l'ont objectivé les observations sur les fibres nerveuses cultivées *in vitro*. Dans ces conditions on voit que l'accroissement des neurites se fait par leur extrémité un peu renflée, qui renferme une substance semblable aux neurofibrilles et qui forme une massue terminale, d'aspect divers et changeant. Selon l'expression de LEVI (1954),

l'expansion terminale des neurites qui s'accroissent présente une forme particulière d'amiboïdisme qui est bien visible dans les films en contraste de phase et à l'accéléré (GODINA 1955).

On peut penser que dans les ganglions sympathiques extirpés au cours des artérites périphériques, un certain nombre de neurites ont été frappés par de telles lésions qui correspondent, quant à la gravité, à une section vraie et nette de la fibre. Par conséquent on peut supposer qu'un certain nombre d'appendices à boule terminale puissent représenter l'extrémité de fibres qui essaient de reconstituer leur continuité matérielle détruite.

Il est évident que si les prolongements nerveux à massue terminale appartiennent à l'une des deux dernières catégories  $\gamma$  ou  $\delta$ , il sera très difficile, voire presque impossible, d'observer au microscope la continuité matérielle entre les boules et le pyrénophore correspondant; celui-ci en effet, est situé d'habitude à une distance trop grande pour qu'on en puisse suivre la fibre tout le long de son parcours.

En résumé les 4 variétés d'appendices à boule terminale<sup>1</sup> entrent dans l'une des deux classes suivantes: ou il s'agit de boules se trouvant à l'extrémité de prolongements cytoplasmiques émanant directement du pyrénophore (variétés  $\alpha$  et  $\beta$ ), ou il s'agit de boules se trouvant à l'extrémité d'une fibre nerveuse (variétés  $\gamma$  et  $\delta$ ). Les appendices de la première classe sont constitués ou par des dendrites vrais et propres (variété  $\alpha$ ), ou bien par des appendices pseudo-dendritiques néoformés (variété  $\beta$ ). En ce qui concerne les appendices de la deuxième classe, les boutons neurofibrillaires se trouvent à l'extrémité terminale d'une fibre nerveuse s'articulant avec un deuxième neurone (variété  $\gamma$ ), ou bien les boutons terminaux matérialisent la tentative d'une fibre nerveuse fortement lésée de reconstituer sa continuité (variété  $\delta$ ). Dans tous les cas les appendices neurofibrillaires à boule terminale témoignent, dans les ganglions sympathiques de la chaîne latéro-vertébrale, d'un état réactionnel prolifératif assez important et par conséquent ils sont l'indice d'un état pathologique de la cellule.

### *c) Capsule péricellulaire*

Parmi les phénomènes morphologiques qui témoignent d'une manière frappante de l'état d'hyperactivité neuronale, il est nécessaire de dire quelques mots de la prolifération de la capsule péricellulaire.

Les cellules nerveuses des ganglions sympathiques, comme d'ailleurs les cellules sensitives des ganglions cérébro-spinaux, sont entourées d'une capsule conjonctive dont la couche la plus externe est par places en continuité avec le conjonctif interstitiel du ganglion. Cette capsule se trouve donc formée d'un certain nombre de fibrilles collagènes disposées tantôt circulairement autour du pyrénophore, tantôt sous forme de plexus; entre ces fibrilles se voient de rares cellules. La surface interne de la capsule fibrillaire est revêtue de cellules lamellaires très aplaties disposées parfois en mosaïque; l'intervalle existant entre la face profonde de la capsule et la surface externe du pyrénophore contient encore d'autres éléments cellulaires de forme variable, le plus souvent ovoïde ou légèrement

<sup>1</sup> A propos de la terminologie la plus suivie, la presque totalité des Auteurs allemands indiquent par le terme de «Kugelphänomene» seulement les formations que nous avons décrites sous  $\alpha$  et  $\beta$ .



étoilée. A l'ensemble de toutes ces cellules on donne le nom de cellules capsulaires ou cellules satellites; certaines d'entre elles s'insinuent dans les anfractuosités existant à la surface du pyrénophore, entre les dendrites et dans les lacunes ou fenêtres se formant parfois au niveau de la partie périphérique du cytoplasme; sur coupes microscopiques elles paraissent quelques fois enfoncées ou nichées dans le protoplasme neuronal. La genèse des cellules capsulaires a été controversée et débattue. CAJAL (1911) les considérait comme des cellules endothéliales et par conséquent de nature mésenchymateuse; les Auteurs plus modernes (LEVI 1954 et d'autres) sont plutôt enclins à les considérer de nature épithéliale, de même origine génétique de l'ectoderme que les cellules nerveuses ganglionnaires; selon ces Auteurs les cellules capsulaires entreraient dans la catégorie des cellules gliales (gliocytes).

L'examen microscopique des ganglions nerveux d'individus atteints de différentes maladies nous a permis de constater souvent que la capsule péricellulaire participe d'une manière bien évidente aux phénomènes prolifératifs frappant la cellule nerveuse. Il faut dire toutefois que si la symptomatologie clinique n'est pas assez intense et que respectivement la morphologie ganglionnaire n'est pas profondément modifiée, les cellules et les fibres de la capsule gardent leur aspect normal. Donc le premier phénomène réactionnel (hypertrophie des dendrites, s'accompagnant ou non de leur hyperplasie) se manifeste toujours dans le neurone au sens propre, tandis que les composants capsulaires ne sont pas encore modifiés. Mais si la stimulation irritative continue à se porter sur la cellule nerveuse, ou mieux encore si son intensité est plus marquée, on constate alors une participation évidente de la capsule aux modifications de nature proliférative. Ces modifications sont matérialisées de la manière suivante: les fibrilles et les cellules capsulaires augmentent en volume et en nombre (Fig. 2, 10, 11 et 12); dans les cas caractérisés par une symptomatologie clinique très grave et par une morphologie ganglionnaire profondément bouleversée, la prolifération capsulaire atteint un haut degré et les fibrilles se fusionnent pour former un manchon collagène épais et homogène qui étrangle visiblement la cellule nerveuse (Fig. 13). Parfois la réaction des cellules capsulaires est beaucoup plus évidente que celle du composant fibrillaire: ce sont alors les cellules capsulaires dont le nombre augmente énormément qui finissent par envahir peu à peu le territoire occupé par la cellule nerveuse; celle-ci, de son côté, est en proie à des phénomènes régressifs et destructifs très graves (Fig. 14, 24 et 31).

L'ensemble des données ressorties de ces observations nous porte à considérer toujours la réaction proliférative de la capsule comme une image morphologique d'ordre pathologique.

En ce qui concerne la signification de la capsule péricellulaire, STÖHR est d'avis que la cellule nerveuse représente avec sa capsule un complexe morphologique unitaire et que les deux composants de cette unité sont étroitement liés entre eux à tous points de vue, soit morphologique soit fonctionnel. Selon STÖHR (1939) donc les cellules de la capsule seraient d'une part intimement unies entre elles sous forme de plasmodium («Hüllplasmodium»), de l'autre ce plasmodium serait en continuité matérielle et plasmatique avec les cellules neuronales. Nos observations ne militent pas en faveur de cette explication, mais au contraire elles démontrent que le neurone et sa capsule sont deux formations distinctes. En

effet, dans bien des cas nous avons constaté une dissociation nette entre le degré de participation du neurone et celui de sa capsule au processus prolifératif: au début de la maladie et dans les cas à symptomatologie clinique légère, seul le neurone réagit, tandis que la capsule maintient une morphologie tout à fait normale. Si, comme il est soutenu par STÖHR (1939), il existait une continuité plasmatique entre le neurone et sa capsule, on devrait constater une participation simultanée et constante des deux composants à n'importe quel phénomène réactionnel.

Nos observations nous ont permis de constater que les cellules capsulaires sont douées d'une résistance beaucoup plus importante que le protoplasme neuronal. Dans bien des cas en effet, le neurone était partiellement ou presque entièrement détruit, alors que les cellules capsulaires, nombreuses, étaient bien conservées et gardaient dans l'ensemble un aspect normal. Il est intéressant à ce propos d'observer les Fig. 14, 24 et 31: le protoplasme neuronal est transformé en un amas pulvérulent, ou réduit à un bloc argentophile ou encore entièrement détruit; par contre la plupart des cellules satellites présentent un aspect encore normal. Cette constatation se rattache à un problème fort intéressant qui concerne la fonction des cellules capsulaires et le rôle qu'elles jouent au sein des ganglions nerveux. Dans des recherches précédentes (CONTI 1946) nous avons mis en évidence par la coloration vitale au Bleu Trypan, dans les ganglions nerveux de la chaîne sympathique latéro-vertébrale du chien, de nombreuses cellules assez volumineuses ayant emmagasiné dans leur cytoplasme des grains de colorant (Fig. 15): ces cellules appartenaient en partie à la trame conjonctive interstitielle du ganglion, mais en partie aussi aux capsules péri-neuronales. En nous basant sur la morphologie de ces éléments et notamment sur la capacité granulo-pexique dont ils étaient doués, nous les avons considérés comme des cellules de type histiocytaire. De plus, en tenant compte des propriétés biologiques des histiocytes nous avons tiré la conclusion que de tels éléments représentaient au sein du ganglion nerveux un mécanisme de défense en faveur des neurones.

L'action de défense réalisée par les histiocytes ganglionnaires se manifeste activement au cours d'états pathologiques lorsque les ganglions sont soumis à des stimuli anormaux. Les histiocytes font face au surcroît de travail défensif qui leur est demandé d'une part en se multipliant, de l'autre en utilisant la capacité notable de résistance dont ils sont pourvus.

### 5. Modifications ganglionnaires de nature dégénérative

Les phénomènes progressifs frappant les cellules nerveuses représentent presque toujours la première étape de l'état réactionnel du neurone. Si la stimulation irritative continue à exercer son action sur la cellule nerveuse et si son intensité augmente encore (comme il arrive dans la presque totalité des cas de maladies vasculaires périphériques), on constate alors l'apparition de phénomènes nettement dégénératifs au sein du protoplasme neuronal: ces phénomènes témoignent d'un état plus grave de souffrance neuronale qui peut aboutir à la mort de la cellule. Evidemment, si les causes irritatives externes se portent sur les ganglions d'une manière très rapide et violente (voir cas 22), la morphologie ganglionnaire est alors caractérisée d'emblée par des phénomènes dégénératifs qui sont plus nombreux que les phénomènes prolifératifs.

Les différentes lésions dégénératives que nous allons étudier ont donné lieu à bien des discussions: sont-elles ou non un facteur qui compromet définitivement la vitalité de la cellule? En d'autres mots ces lésions sont-elles définitives ou réversibles? A ce sujet, les lois biologiques valables pour tout protoplasme vivant nous semblent aussi valables pour le protoplasme neuronal: les différentes lésions dégénératives à leur stade initial et localisées à la partie périphérique du cytoplasme, donc limitées, sont susceptibles de disparaître avec *restitutio ad integrum* du protoplasme neuronal si les causes qui les déterminent cessent graduellement. Mais au contraire si les stimuli anormaux continuent à se porter sur les ganglions nerveux (et c'est la règle dans les cas d'artérites périphériques), les altérations régressives s'étendent toujours davantage et atteignent un degré tel que toute vitalité cellulaire et toute conduction nerveuse en sont définitivement compromises.

La morphologie des phénomènes régressifs est assez polymorphe, tant d'un ganglion à l'autre, que dans les différentes cellules d'un même ganglion. Partant d'images qui reproduisent les phénomènes dégénératifs initiaux (vacuolisation périphérique, corrosion des bords du corps cellulaire), on passe graduellement à des images régressives plus marquées: la vacuolisation s'étend et envahit tout le cytoplasme; la corrosion s'accroît; les neurofibrilles s'hypertrophient, se réunissent en amas volumineux, se fragmentent enfin; le noyau lui aussi présente des signes manifestes de souffrance se traduisant avant tout par la disparition de sa membrane. On arrive enfin aux images les plus graves de la régression cellulaire qui aboutit parfois à la fragmentation totale du protoplasme, quelquefois à sa transformation en une masse homogène ou hyaline ou d'aspect pulvérulent. Bien que les phénomènes dégénératifs soient caractérisés par un polymorphisme important, il faut toutefois reconnaître que leur progression se réalise suivant un ordre topographique assez constant: les phénomènes régressifs frappent toujours en premier lieu le cytoplasme tandis que le noyau en est encore préservé. Ceci découle du fait que le noyau est doué d'une capacité de résistance notablement plus importante que celle du cytoplasme; il n'est pas rare, en effet, de voir l'image d'un cytoplasme notablement altéré entourant un noyau encore indemne.

Dans la description suivante ces altérations régressives sont analytiquement passées en revue; mais il faut préciser que parfois différentes modifications régressives frappent simultanément un même neurone qui acquiert ainsi un aspect hautement polymorphe.

#### a) *Vacuolisation*

L'apparition de vacuoles représente une image dégénérative assez fréquente. L'étude de notre matériel permet d'établir les différentes étapes de ce phénomène qui se déroule schématiquement à peu près de la manière suivante: les vacuoles font leur apparition dans la partie périphérique du cytoplasme qui est déjà atteint, en règle générale, de phénomènes prolifératifs; elles sont d'abord petites, puis elles augmentent de volume et s'étendent graduellement vers la partie centrale de la cellule où siège le noyau. L'apparition et l'augmentation des vacuoles provoquent la destruction concomitante de l'appareil neurofibrillaire de la cellule et, par conséquent, dans les cas extrêmes de vacuolisation, la vitalité cellulaire en est définitivement compromise (Fig. 16, 17 et 18). Dans bien des cas le neurone tout entier est transformé en un amas de vacuoles entourant un noyau encore bien conservé; ces images (Fig. 18 et 19) démontrent que le



cytoplasme est notablement moins résistant que le noyau aux stimuli anormaux. Les ganglions de certains patients dont la maladie avait atteint un haut degré de gravité, présentent des images de vacuolisation cellulaire encore plus marquées et aboutissent même à la destruction totale du noyau (Fig. 20, 22 et 32).

Dans les cas cliniquement les plus graves, marqués par une morphologie ganglionnaire particulièrement dégénérée, il existe également des vacuoles au sein des prolongements émanant de la cellule (Fig. 22) et encore le long des fibres nerveuses intraganglionnaires (Fig. 23). Il est évident que la conduction nerveuse le long de tels prolongements est fort compromise. L'image de ces vacuoles est variable. Parfois elles se présentent le long des fibres sous forme de varicosités séparées assez régulièrement les unes des autres; les fibres reproduisent dans ces cas l'image d'un chapelet. Parfois les vacuoles sont intensément argentophiles et à leur intérieur les neurofibrilles sont hypertrophiées agglutinées, réduites en un amas homogène. Ailleurs par contre les neurofibrilles ont entièrement disparu et les nodosités présentent un aspect nettement vacuolaire. Dans certains champs microscopiques la totalité des fibres nerveuses visibles présente ces images qui témoignent de la souffrance remarquable du ganglion. Il ne faut pas croire que la dégénérescence vacuolaire des prolongements nerveux (dendrites et neurite) soit toujours secondaire à la vacuolisation du cytoplasme neuronal. Un cas par exemple (Fig. 21) montre des dendrites sous l'aspect de tuyaux vides se détachant d'un pyrénophore par ailleurs normal; mais dans ce même cas il est possible de constater aussi la présence de prolongements nerveux vacuolisés se détachant de neurones rongés, corrodés, frappés de phénomènes régressifs notables. Ces prolongements nerveux vacuolisés sont, en règle générale, d'un volume assez important, sans doute plus gros que normalement. Parfois les dendrites vacuolisés paraissent fragmentés au niveau de leur extrémité distale; dans certains cas la vacuolisation fait son apparition précisément à cet endroit et progresse ensuite en direction cellulipète; dans d'autres cas enfin la vacuolisation commence dans la partie proximale du dendrite et s'étend ensuite à la partie distale. Toujours dans des cas graves on peut constater une image hautement caractéristique consistant en un amas central argentophile ou pulvérulent entouré de nombreux prolongements ratatinés, intensément argentophiles ou vacuolisés.

Quant à la signification et à l'importance du phénomène de vacuolisation il est nécessaire d'apporter une précision. Si la vacuolisation frappe avant tout le pyrénophore et ses dendrites, la genèse de ces vacuoles est facilement compréhensible si l'on pense que les stimuli anormaux ont porté leur atteinte en premier lieu au corps cellulaire. La présence de vacuoles le long du neurite ou de la fibre nerveuse appartenant à un neurone par ailleurs d'aspect plus ou moins normal est moins facilement compréhensible de prime abord. Mais les expériences de section des fibres nerveuses peuvent élucider cette donnée. En effet, les études de la dégénérescence wallérienne ont démontré que dans la portion périphérique d'une fibre ou d'un nerf sectionné, c'est l'axone qui dégénère le premier en se fragmentant en une série de tronçons ou de granules. Ensuite la myéline se modifie à son tour, devient moins brillante, se gonfle en certains points et se fragmente en formant des sphères ou des ovoïdes ayant l'aspect de vacuoles de dimensions variables, renfermant souvent des débris altérés de neurite. Sur la base de ces données expérimentales on peut penser que, dans les

ganglions sympathiques les plus gravement atteints, un certain nombre de neurites ont été frappés par des lésions qui sont superposables, quant à la gravité, à une section de la fibre. Par conséquent de nombreuses vacuoles font leur apparition le long de ces fibres fortement lésées et ces altérations frappant la partie périphérique du neurone peuvent se répercuter sur les corps cellulaires correspondants qui dégénèrent par la suite: c'est la dégénérescence rétrograde qui démontre, d'une manière brillante et sur du matériel pathologique, que les différentes parties du neurone sont étroitement liées entre elles et bien solidaires tant au point de vue morphologique que fonctionnel.

### *b) Autres images dégénératives*

Les images des cellules en régression ne se limitent pas à celles susmentionnées. Parfois les cellules nerveuses ganglionnaires diminuent notablement de volume, s'atrophient, leur contour devient flou et ne marque plus une limite nette vis-à-vis du tissu environnant, le réseau neurofibrillaire disparaît et le neurone se transforme enfin en une masse argentophile hyper- ou hypo-imprégnée, au sein de laquelle aucun composant morphologique n'est plus reconnaissable (Fig. 24 et 25). Il n'est pas rare d'observer ces phénomènes régressifs frapper un neurone préalablement atteint de phénomènes progressifs marqués: dans ces cas on peut voir en même temps des image progressives et régressives qui arrivent à un haut degré de complication et de polymorphisme (Fig. 26 et 27). Dans d'autres cas on observe un épaississement important de la capsule périneuronale et une augmentation marquée des cellules satellites; ces dernières sont parsemées entre des blocs argentophiles fragmentés qui témoignent de la destruction totale du neurone. Une autre image, observée aussi avec une certaine fréquence, consiste en la transformation totale du neurone en un amas pulvérulent (Fig. 28 et 29) constitué par de nombreuses granulations amorphes qui ne rappellent en rien la précédente structure neurofibrillaire; lorsque cette «pulvérisation» du neurone se réalise, la limite périphérique de la cellule peut être encore assez bien conservée. Dans certains cas la cellule pulvérulente ne renferme plus de composants argentophiles; dans d'autres cas par contre on voit encore au sein de la masse pulvérulente des vestiges nucléaires représentés par quelques boules assez intensément noires.

La résorption des neurones détruits est vraisemblablement facilitée par la présence de cellules de type histiocyttaire au sein des ganglions nerveux. A ce propos HERZOG (1950, 1955) et d'autres Auteurs parlent de «neuronophagie» et pensent que les cellules capsulaires se transforment en prenant les propriétés biologiques des histiocytes et deviennent ainsi de vrais phagocytes qui procèdent à la résorption des neurones détruits. Nos recherches précédentes (voir p. 534, Fig. 15) confirment le point de vue de HERZOG (1950): en effet, dans les ganglions sympathiques de la chaîne latéro-vertébrale du chien nous avons constaté nombre de cellules capables d'exercer la granulopexie expérimentale et vraisemblablement aussi la phagocytose in vivo.

### *c) Noyau*

Il semble intéressant maintenant de dire un mot du comportement du noyau lors des différents phénomènes régressifs illustrés ci-dessus. Une donnée qui frappe est représentée par la résistance notable du noyau aux stimuli anormaux,

même violents: dans plusieurs cas, le noyau des neurones présentait encore des caractères plus ou moins normaux alors que le cytoplasme contenait des vacuoles, ou que son réseau neurofibrillaire était en voie de désagrégation. Sans doute la résistance du noyau est due en grande partie à la présence de la membrane nette qui l'entoure. Si les phénomènes régressifs qui frappent le cytoplasme progressent et atteignent la membrane nucléaire, celle-ci se dissout et disparaît; le noyau subit des modifications particulières consistant en une homogénéisation progressive qui aboutit enfin à un bloc compact et fortement colorable, ou bien les modifications nucléaires aboutissent à une désagrégation et à une fragmentation importante: les amas nucléaires se dispersent dans le cytoplasme, puis s'effacent.

HAGEN (1945) a consacré un travail au problème du nombre des noyaux d'un neurone. Elle est arrivée à la conclusion que, lorsque la morphologie des cellules nerveuses est assez profondément altérée (HAGEN 1945, 1949, a aussi étudié des ganglions extirpés au cours de maladies vasculaires périphériques), la présence de deux noyaux dans le neurone représente un fait assez constant et témoigne, avec les autres images morphologiques, de l'état de souffrance neuronale. Une attention particulière n'a pas été portée lors de la présente étude à ce problème: toutefois dans certains cas nous avons eu l'occasion d'observer des cellules nerveuses comportant deux ou trois noyaux.

En ce qui concerne le comportement du noyau, la position extrêmement excentrique de celui-ci nous a souvent frappés. KUNTZ (1938) déjà avait signalé la position très excentrique du noyau dans un cas d'arthrite déformante; STÄMMLER (1923) aussi relate qu'au cours de maladies infectieuses aiguës les noyaux des neurones tendent à se porter plus excentriquement. Dans les coupes examinées pour cette publication, parallèlement aux lésions régressives du neurone, le noyau semble se déplacer graduellement vers la périphérie pour arriver enfin aux images de «noyau expulsé» (Fig. 30) dont nous avons déjà fait mention (voir cas de mégadolichocôlon).

A propos de l'importance des lésions nucléaires, HERZOG (1950) insiste sur le concept qu'une cellule nerveuse doit être considérée comme vraiment lésée lorsqu'aux lésions cytoplasmiques s'associent de véritables signes de souffrance nucléaire. Sur la base de notre expérience et de nos observations nous ne pouvons partager l'idée de HERZOG (1950). En effet, dans bien des cas, des signes importants de dégénérescence neuronale atteignent seulement le cytoplasme et bien que la participation du noyau aux phénomènes régressifs fut nulle, le neurone n'avait plus de chances de survivre. Nos recherches ont démontré en définitive que le noyau présente des lésions manifestes seulement dans la phase très avancée de la maladie, à un stade où toute conduction de stimulation nerveuse est déjà irrémédiablement compromise.

### Conclusions

Cette étude a mis en évidence qu'au cours de certaines maladies (maladies vasculaires périphériques, lésions vasculaires périphériques violentes déterminées par le froid, mégadolichocôlon) la morphologie des ganglions nerveux de la chaîne sympathique latéro-vertébrale et du ganglion cœliaque est plus ou moins intensément modifiée.

Les modifications ganglionnaires observées ont pu être groupées dans les trois variétés suivantes:



- modifications ganglionnaires à morphologie proliférative;
- modifications ganglionnaires à prédominance proliférative mais comportant aussi des phénomènes dégénératifs;
- modifications ganglionnaires à prédominance dégénérative mais comportant aussi des phénomènes prolifératifs.

Aucune de ces trois variétés n'est nécessairement liée à une maladie donnée.

Pour les maladies vasculaires périphériques ayant une base organique (maladie de Bürger) on a constaté que le degré et l'intensité des modifications ganglionnaires étaient étroitement liés à la nature et à la force des stimuli anormaux qui se manifestent objectivement par la gravité clinique de la maladie. Dans les maladies vasculaires périphériques à base fonctionnelle (maladie de Raynaud) cette interdépendance n'a pas pu être objectivée d'une manière aussi formelle; au reste le nombre des cas étudiés était trop restreint.

Si l'on a pu constater, dans la maladie de Bürger, un lien entre les modifications ganglionnaires et la gravité de la maladie, il n'en a pas été de même pour un autre facteur qui avait été pris en considération, c'est-à-dire la durée de la maladie. Les cas cliniques étudiés ont démontré que ce facteur n'influence pas de manière sensible la morphologie ganglionnaire. En effet, dans plusieurs cas où la maladie existait depuis longtemps mais où la symptomatologie clinique se présentait sous forme discrète, les ganglions sympathiques étaient caractérisés par des modifications peu importantes, parfois presque dans les limites de la normale. A l'opposé, dans bien des cas où la maladie datait seulement de quelques mois, mais où la symptomatologie était marquée, la morphologie ganglionnaire était souvent caractérisée par des images prolifératives mais aussi dégénératives importantes.

Ayant pu suivre les malades pendant et après leur hospitalisation, il nous a été donné de faire l'observation suivante: les malades qui ont retiré les plus grands avantages de la sympathectomie sont ceux dont la symptomatologie clinique était légère et, parallèlement, la morphologie ganglionnaire très peu modifiée, même si dans quelques-uns de ces cas la maladie datait depuis quelques années. Si, par contre, le patient présentait une symptomatologie clinique grave, s'accompagnant d'une morphologie ganglionnaire caractérisée par des lésions prolifératives et dégénératives importantes, l'intervention chirurgicale n'a pas donné de résultat satisfaisant même si la maladie était récente. Ces observations cliniques confirment en définitive non seulement l'existence d'un lien étroit entre les modifications ganglionnaires et la gravité de la maladie, mais aussi l'absence d'un rapport entre les altérations ganglionnaires et la durée de la maladie.

Cette constatation nous amène à faire des considérations sur la genèse des différentes maladies que nous avons eu l'occasion d'étudier.

Pour la maladie de Bürger, les données qui découlent de cette étude, permettent de fixer, par des images assez précises, l'histopathologie ganglionnaire de la maladie et démontrent la corrélation entre le degré des lésions vasculaires périphériques et l'intensité des lésions ganglionnaires. Cependant elles ne sont d'aucun secours pour fixer le système, vasculaire ou ganglionnaire, qui représente le siège topographique où débudent les lésions.

Nombre d'Auteurs affirment que les lésions morphologiques primaires de la maladie de Raynaud ont leur origine au niveau du système nerveux (moelle épinière ou mieux encore ganglions nerveux sympathiques de la chaîne

latéro-vertébrale). Les bons résultats obtenus généralement par la sympathectomie ganglionnaire semblent confirmer le point de vue selon lequel la maladie de Raynaud représente une affection dont la genèse est liée à des altérations primaires nerveuses qui se traduisent à la périphérie par des troubles d'ordre fonctionnel. Les résultats de ce travail s'accordent assez bien avec ce point de vue. En effet, dans les trois cas de maladie de Raynaud étudiés, l'artériographie n'a pas mis en évidence de lésion vasculaire tandis que la morphologie ganglionnaire était caractérisée dans 2 cas sur 3 par des modifications d'ordre essentiellement prolifératif. Dans ces deux cas les modifications ganglionnaires de moyenne intensité vont de pair avec la symptomatologie clinique modérée.

Si la genèse des lésions ganglionnaires sympathiques n'est pas encore élucidée dans les maladies vasculaires périphériques, notamment pour celles qui ont une base vasculaire organique, il existe par contre d'autres formes de lésions périphériques vasculo-nerveuses nécrotiques au cours desquelles la morphologie ganglionnaire peut être très intensément modifiée et dont la genèse peut s'expliquer assez aisément. Je me réfère au cas 22 déjà illustré: il s'agit d'un patient chez lequel une cause violente (froid très intense) a déterminé en un laps de temps relativement court une gangrène périphérique au niveau des extrémités des membres inférieurs. Une sympathectomie lombaire réalisée 25 jours après la congélation n'a pas amélioré l'état nécrotique périphérique: le patient a dû subir par la suite l'amputation des pieds. Au microscope les ganglions nerveux de ce malade ont révélé des modifications très importantes reproduisant toute la gamme des lésions progressives et surtout dégénératives. Il est évident que ces modifications ganglionnaires sont secondaires aux lésions nécrotiques localisées à la périphérie des membres. L'expérimentation peut nous aider à comprendre le déroulement des différentes étapes du phénomène. La section et la destruction des fibres nerveuses ont démontré que si elles ne sont pas suivies de la régénération de la fibre, des phénomènes réactionnels se manifestent très tôt au niveau du pyrénophore, parfois déjà au cours des premières 24 heures. L'image cytologique de la réaction des neurones se traduit au début par une turgescence du cytoplasme et par une désagrégation de la substance de Nissl; au centre du pyrénophore apparaissent ensuite des granulations lipidiques; la cellule nerveuse perd peu à peu sa colorabilité et les cellules tombent enfin en atrophie totale. D'autres expériences réalisées chez des embryons précoces ou chez des animaux en voie d'accroissement ont mis en évidence le fait suivant: si l'on coupe la connection d'une fibre nerveuse avec son organe effecteur périphérique, ou si on interrompt la conduction de la stimulation nerveuse au niveau d'une synapse interneuronale, l'absence de transmission nerveuse provoque dans les pyrénophores correspondants des phénomènes régressifs aboutissant fatalement à l'atrophie du neurone. Ces données de l'expérimentation peuvent être appliquées à ce cas pour expliquer la genèse des graves lésions ganglionnaires: en effet, on peut penser que l'action violente du froid sur la périphérie du membre a déterminé soit la destruction de nombreuses fibres nerveuses, soit une interruption de multiples synapses périphériques provoquant, par voie rétrograde, des lésions des pyrénophores ganglionnaires correspondants. Il existe encore d'autres faits qui peuvent servir à éclairer davantage la genèse des lésions ganglionnaires de ce cas particulier. Des études morphologiques devenues classiques ont mis en évidence, chez des patients amputés d'un membre, l'atrophie des neurones somato-moteurs correspondants

qui siègent dans la moelle épinière. Toujours dans ce domaine il faut encore citer les expériences plus anciennes de PANIZZA et GUDDEN qui ont révélé une atrophie progressive des centres optiques (corps géniculé et écorce calcarine) à la suite de l'extirpation du bulbe oculaire chez des animaux en voie de croissance. Ces observations soulignent donc l'importance des territoires périphériques qui exercent une influence trophique indiscutable sur les neurones centraux d'où partent les fibres nerveuses destinées à ces mêmes territoires. Dans le cas de gelure, la nécrose des différents composants morphologiques (peau, vaisseaux sanguins, troncs nerveux, musculature lisse et striée) peut être superposée, quant à la répercussion qu'elle a pu avoir sur les centres nerveux correspondants, soit à l'amputation d'un membre soit à l'extirpation du bulbe oculaire.

Enfin nous avons eu l'occasion d'étudier les ganglions nerveux sympathiques de la chaîne lombaire et le ganglion coeliaque dans un cas de mégadolichocôlon; ces ganglions ont montré au microscope la gamme très étendue des lésions morphologiques prolifératives et régressives (voir p. 513 et suivantes). L'intérêt de ce cas réside dans le fait qu'il souligne, de manière très claire, l'importance du composant nerveux dans le déterminisme de la maladie de Hirschsprung. Mais, à la différence des Auteurs précédents qui, tous, ont pris en considération, pour la genèse de cette maladie, le composant nerveux intramural, il nous a été donné de mettre en évidence des lésions ganglionnaires indiscutablement plus marquées dans un territoire nerveux plus proximal, c'est-à-dire dans les ganglions de la chaîne sympathique latéro-vertébrale et dans le ganglion coeliaque.

### Résumé

L'Auteur a étudié 52 ganglions nerveux sympathiques (ganglion cervical inférieur, ganglion stellaire, les trois premiers ganglions de la chaîne sympathique lombaire, ganglion coeliaque) extirpés chirurgicalement à des patients souffrant des maladies suivantes: maladie de Bürger, maladie de Raynaud, troubles vasculaires périphériques déterminés par compression veineuse, lésions nécrotiques dues à congélation, mégadolichocôlon. Les ganglions nerveux ont été imprégnés selon les méthodes au nitrate d'argent de CAJAL-DE CASTRO et de BIELSCHOWSKY-GROS.

Les résultats de cette étude peuvent être schématisés de la manière suivante:

1. Au cours des maladies mentionnées ci-dessus la morphologie des ganglions nerveux sympathiques est plus ou moins intensément modifiée.

2. L'histo-pathologie ganglionnaire a été fixée par des images assez précises qui peuvent être schématiquement groupées en trois variétés:

- modifications ganglionnaires à morphologie proliférative;
- modifications ganglionnaires à prédominance proliférative mais comportant aussi des phénomènes dégénératifs;
- modifications ganglionnaires à prédominance dégénérative mais comportant aussi des phénomènes prolifératifs.

Aucune de ces trois variétés de modifications ganglionnaires n'est nécessairement liée à une maladie donnée.

3. Dans la maladie de Bürger le degré et l'intensité des modifications ganglionnaires sont étroitement liés à la gravité de la maladie; par contre le facteur «durée de la maladie» n'influence pas d'une manière appréciable la morphologie ganglionnaire.



4. Dans un cas de mégadolichocôlon ont été étudiés pour la première fois (les Auteurs précédents se sont attachés seulement à l'étude du métaganglionnaire du segment intestinal réséqué) le ganglion coeliaque et les ganglions de la chaîne sympathique lombaire extirpés chirurgicalement à un garçon souffrant de cette maladie. Des altérations notables reproduisant la gamme très étendue des lésions prolifératives et notamment dégénératives y ont été constatées et décrites. La mise en évidence de ces altérations accentue l'importance et la prédominance du composant nerveux proximal par rapport au distal dans la genèse de la maladie de Hirschsprung.

### Bibliographie

- ANTONINI, R., G. AREZIO e P. METALLI: Il sistema gangliare simpatico-lombare nelle arteriopatie sperimentali da omolesioni liberi e ripetuti di surrene. *Minerva cardioangiol.* (Torino) **5**, 132 (1957).
- AQUILA, N.: Alterazioni del sistema nervoso simpatico gangliare conseguenti a flebiti sperimentali. *Gazz. int. Med. Chir.* **62**, 767—776 (1957).
- ASCHIERI, F., e A. MAZZELLA: Le cellule gangliari simpatiche negli arteriopatici: analisi statistica per età. *Minerva cardioangiol.* (Torino) **4**, 298 (1956).
- ASCOLI, BELA HALLER, BETHE, KÖLLIKER, MICHAÏLOW, MONTI et RIQUIER: Cités par PENSA.
- BERGMANN, L.: The blood vessels of human celiac ganglia and changes in their vascular pattern associated with age. *Anat. Rec.* **85**, 117—129 (1943).
- BISCHOP, G. DE: Über pathologische Veränderungen am Auerbachschen Plexus bei Megacolon. *Z. Zellforsch.* **34**, 141—159 (1949).
- BÖRGER, G.: Funktion und Morphologie im peripheren vegetativen Nervensystem unter experimentellen Bedingungen (Untersuchungen am Ganglion coeliacum des Kaninchens). *Acta neuroveg.* (Wien) **13**, 485—580 (1956).
- BOTAR, J.: Recherches qualitatives et quantitatives sur les cellules nerveuses du ganglion coeliaque de l'homme. *C. R. Ass. Anat.* **42**, 1441—1443 (1955).
- Recherches qualitatives et quantitatives des cellules nerveuses du ganglion coeliaque de l'homme sénéscent. *C. R. Ass. Anat.* **42**, 1444—1446 (1955).
- Qualitative und quantitative Untersuchung der Nervenzellen des Ganglion coeliacum im Alter. *Acta anat. (Basel)* **28**, 157—206 (1956).
- Qualitative und quantitative Untersuchung der Nervenzellen des Ganglion coeliacum am gesunden Menschen. *Acta anat. (Basel)* **26**, 192—245 (1956).
- CAJAL, S. RAMON Y: Histologie du système nerveux, tome 2. Paris: Maloine 1911.
- CAMERON, TITTEL, DELLA VALLE, ROBERTSON, KERNOHAN, TIFFIN, ZÜLZER et WILSON: Cités par HERZOG.
- CASTIGLIONI, G. C.: Ghiandole surrenali ed endoarterite obliterante. *Minerva cardioang.* (Torino) **4** (1956).
- CONTI, G.: Etudes sur la morphologie des cellules des ganglions sympathiques intramuraux du cœur humain. *Acta anat. (Basel)* **5**, 255—290 (1948).
- Cellules ganglionnaires sympathiques du système spécifique du cœur humain. *Acta anat. (Basel)* **10**, 315—326 (1950).
- Über die Veränderungen der sympathischen Ganglienzellen des Appendix vermiformis in Abhängigkeit vom Lebensalter und im Verlauf der chronischen Appendicitis. *Schweiz. Z. Path.* **15**, 80—101 (1952).
- L'innervazione del polmone normale e del polmone residuo. *Z. Zellforsch.* **38**, 148—177 (1953).
- CRAIG, W. M., and J. W. KERNOHAN: The surgical removal and histological studies of sympathetic ganglia in Raynaud's Disease, thrombo-angiitis obliterans, chronic infections arthritis, and scleroderma. *Surg. Gynec. Obstet.* **56**, 767—778 (1933).
- ENGELBRECHT, W.: Über Zahl und Deutung degenerierter Ganglienzellen in sympathektomierten Grenzstrangganglien. *Klin. Wschr.* **29**, 41—49 (1951).
- ETZEL, E.: Neuropatologia de megacofago e megacolo. *Ann. Fac. Med. Univ. S. Paulo* **10**, 3 (1935).

- FEYRTER, F.: Die Pathologie der vegetativen, nervösen Peripherie. Verh. dtsch. Ges. Path. (34. Tagg) Wiesbaden, 86—109 (1950).
- GODINA, G.: Le modalità d'accrescimento degli assoni studiate a contrasto di fase in espianti di tessuto nervoso «in vitro». Z. Zellforsch. **42**, 77—93 (1955).
- HAGEN, E.: Beitrag zur Histopathologie des Halsgrenzstranges bei der Raynaudschen Erkrankung. Z. Zellforsch. **33**, 68—85 (1943/44).
- Über das Vorkommen und die Bedeutung mehrkerniger Ganglienzellen im vegetativen Nervensystem. Z. Zellforsch. **33**, 424—438 (1945).
- Zur Individualanatomie des Ganglion solare beim Menschen. Normale und pathologische Befunde. Z. Zellforsch. **34**, 257—279 (1949).
- Beobachtungen zur pathologischen Histologie des vegetativen Nervensystems bei verschiedenen Erkrankungen des Gefäßapparates. Z. Anat. **114**, 420—437 (1949/50).
- HERMANN, H.: Mikroskopische Studien am Grenzstrang des Sympathikus beim Menschen. Anat. Anz. Entwickl.-Gesch. **98**, 181—185 (1951).
- Einige Bemerkungen zur pathologischen Histologie des peripheren vegetativen Nervensystems. Klin. Wschr. **29**, 23—24 (1951).
- Pathologische Histologie des peripheren vegetativen Nervensystems. Berlin, Medizinische Verlagsanstalt 1956.
- HERZOG, E.: Prinzipielles zur normalen und pathologischen Histologie des peripheren vegetativen Nervensystems. Klin. Wschr. **26**, 641—648 (1948).
- Die Pathologie der peripheren vegetativen Ganglien. 34. Tagg der Deutsch. Ges. Pathol. in Wiesbaden, S. 52—86, 1950.
- Die Pathologie des peripheren vegetativen Nervensystems. Neue med. Welt **15** (1950).
- Los ganglios simpáticos en la trombangitis obliterante. Gaz. méd. port. **4**, 631—640 (1951).
- Bedeutung und Kritik des nervösen, vegetativen Terminalreticulums (STÖHR). Acta neuroveg. (Wien) **10**, 110—135 (1954).
- Histopathologie des vegetativen Nervensystems. In Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie von F. HENKE, O. LUBARSCH u. R. RÖSSLE, Bd. XIII/5. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- , u. E. SCHÜLER: Experimenteller Beitrag zur Frage der Ermüdung der sympathischen Ganglienzellen. Beitr. path. Anat. **106**, 178—193 (1941).
- HORTOLOMEI, N., et T. GHITESCO: L'innervation des anévrismes. Lyon chir. **54**, 368—372 (1958).
- HÜLSBERG, E.: Histopathologische Beobachtungen am sympathischen Grenzstrang nach Behandlung eines Larynx-Carcinoms mit Röntgenstrahlen. Dtsch. Z. Nervenheilk. **168**, 35—51 (1952).
- JABONERO, V.: Etudes sur la morphopathologie des cellules interstitielles du système neurovégétatif périphérique. Biol. lat. (Milano) **4**, 323—356 (1951).
- Le syncytium nerveux distal des voies végétatives efférentes. Acta neuroveg. (Wien) **8**, 291—324 (1954).
- JÄGER, E.: Zur pathologischen Anatomie der Thrombangitis obliterans bei juveniler Extremitätengangrän. Virchows Arch. path. Anat. **284**, 526—622 (1932).
- KUNTZ, A.: Sympathetic ganglions removed surgically. A histopathologic study. Arch. Surg. (Chicago) **28**, 920—935 (1934).
- Histological variations in autonomic ganglia and ganglion cells associated with age and disease. Amer. J. Path. **14**, 783—795 (1938).
- , and N. M. SULKIN: Lesions induced in rabbits by cholesterol feeding, with special reference to their origin. Arch. Path. (Chicago) **47**, 248—260 (1949).
- LEVI, G.: Trattato di istologia. Torino: Utet 1954.
- MALAN, E., et J. CELESTINO DA COSTA: Physiopathologie des oblitérations artérielles chroniques. Lyon: L. Pidancet (1952).
- , et A. PUGLIONISI: Effets de la ganglionectomie lombaire sur la fonction vasculaire. Acta neuroveg. (Wien) **14**, 190—203 (1956).
- MANNINO, R.: Il comportamento delle cellule nervose del coledoco e del cistico soprastanti ad una stenosi. Pat. sper. **38**, 305—318 (1949).
- MARCOZZI, G., S. MESSINETTI e G. A. RICCI: Arteriopatie obliteranti degli arti inferiori. Roma: E. M. E. S. 1959.

- MAZZELLA, A., e E. ASCHIERI: Le cellule gangliari simpatiche negli arteriopatici: aspetti istopatologici. *Minerva cardioangiol.* (Torino) **4**, 320 (1956).
- — e G. AZZALI: Le cellule dei gangli simpatichi nelle arteriopatie. *Monit. zool. ital. Suppl.* **63**, 343—346 (1954).
- MONTORSI, W., C. GHIRINGHELLI, G. TIBERIO e F. LAVORATO: Considerazioni sui risultati a distanza della gangliectomia lombare nelle arteriopatie degli arti inferiori. *Rass. med.* (Milano) **34**, 369—378 (1957).
- NICOLOSI, G.: Sul comportamento delle cellule nervose dell'intestino soprastante ad una stenosi. *Arch. ital. Chir.* **37**, 70—96 (1934).
- OTTAVIANI, G., e P. CAVAZZANA: Osservazioni sulle cellule interstiziali di Cajal. *Arch. ital. Anat. Embriol.* **43**, 75—89 (1940).
- PANIZZA, et GUDDEN: Cités par G. LEVI.
- PENSA, A.: Trattato di Istologia Generale. Milano: S. E. L. 1951.
- PARODI, L., e E. CAPELLINI: Risultati immediati e lontani della chirurgia del simpatico lombare nelle arteriopatie croniche obliteranti degli arti inferiori. *Minerva cardioangiol.* (Torino) **4** (1956).
- SARTER, J.: Beitrag zur normalen und pathologischen Histologie der Endausbreitung des vegetativen Nervensystems. *Acta anat.* (Basel) **30**, 681—705 (1957).
- SCHÜLER, E.: Contribucion al estudio del sistema nervioso vegetativo en actividad y en reposo. *Bol. Soc. Biol. Concepcion* **15**, 63—78 (1941).
- SKOOG, T.: Histological investigation of the resected sympathetic ganglia in two operated cases of thrombangiitis obliterans, with observations on a number of vascular reactions. *Acta chir. scand.* **94**, 49—64 (1946).
- STÄMMLER, M.: Zur Pathologie des sympathischen Nervensystems, im besonderen über seine Bedeutung für die Entstehung der Arteriosklerose. *Beitr. path. Anat.* **71**, 388 (1923).
- STAUDACHER, V.: Contributo alla conoscenza dei dispositivi nervosi intramurali nel megacolon congenito e secondario. *Arch. «De Vecchi»* **11**, 99—120 (1948).
- STÖHR jr., PH.: Über „Nebenzellen“ und deren Innervation in Ganglien des vegetativen Nervensystems, zugleich ein Beitrag zur Synapsenfrage. *Z. Zellforsch.* **29**, 569—612 (1939).
- Studien zur normalen und pathologischen Histologie vegetativer Ganglien. *Z. Zellforsch.* **32**, 587—635 (1943).
- Studien zur normalen und pathologischen Histologie vegetativer Ganglien (II). *Z. Zellforsch.* **33**, 109—142 (1943/44).
- Studien zur normalen und pathologischen Histologie vegetativer Ganglien (III). *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **114**, 14—52 (1949/50).
- Anatomische Grundlagen der Lehre vom vegetativen Nervensystem. Regensburg. Jb. ärztl. Fortbild. **2**, 1—10 (1951).
- Zusammenfassende Ergebnisse über die Endigungsweise des vegetativen Nervensystems. *Acta neuroveg.* (Wien) **10**, 21—109 (1954).
- SUNDER-PLESSMANN, P.: Die Raynaudsche Erkrankung und ihr Formenkreis. *Dtsch. Z. Chir.* **251**, 125—194 (1938).
- TATTONI, G., G. BOUNONS e N. CINICOLA: Risultati della terapia clinica delle arteriti obliteranti senili. *Minerva med.* (Torino) **46**, 1—11 (1955).
- TERNI, T.: Sulla correlazione fra ampiezza del territorio di innervazione e grandezza delle cellule gangliari. *Arch. ital. Anat. Embriol.* **17**, 507—543 (1919).
- Ricerche sulla struttura e sull'evoluzione del simpatico dell'uomo. *Monit. zool. ital.* **33**, 63—72 (1922).
- Struttura dei neuroni simpatici e età dell'uomo. *Monit. zool. ital.* **40**, 91—92 (1929).
- Sulla moderna morfologia del sistema nervoso autonomo. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **10**, 993—1129 (1935).
- TONI, G., e A. MACCAFERRI: Osservazioni morfo-funzionali sul simpatico lombare. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **28**, 838—844 (1952).
- TRUEX, R. C.: The sympathetic ganglions of hypertensive patients. *Arch. Path.* (Chicago) **51**, 186—191 (1951).

Prof. Dr. G. CONTI,

Directeur de l'Institut d'Histologie et d'Embryologie générale, Fribourg, Suisse



Aus dem Anatomischen Institut der Universität Kiel  
(Direktor: Prof. Dr. med. W. BARGMANN)

## ÜBER DIE MORPHOLOGIE DER MILCHSEKRETION. II ZUGLEICH EINE KRITIK AM SCHEMA DER SEKRETIONSMORPHOLOGIE\*

Von

W. BARGMANN, K. FLEISCHHAUER und A. KNOOP\*\*

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Dezember 1960)

### I. Einleitung und Fragestellung

In früheren Untersuchungen wurde über Beobachtungen an der laktierenden Brustdrüse der Ratte berichtet, die sich mit den im Schrifttum vorherrschenden Angaben über die sog. apokrine Sekretion der Milch nicht vereinbaren lassen (BARGMANN und KNOOP 1959, BARGMANN 1959). Nach den elektronenmikroskopischen Feststellungen der genannten Autoren sondern die Drüsenzellen der Glandula mammaria einmal Proteinteilchen in die Alveolumina ab, die lichtmikroskopisch nicht faßbar sind; die Eiweißnatur dieser Granula ist durch WELLINGS, GRUNBAUM und DE OME (1960) erwiesen worden. Ferner scheidet die Milchdrüsenzelle lichtmikroskopisch sichtbare Fettkügelchen ab, die von einer feinen Membran umhüllt sind; diese Membran besteht nach BARGMANN und KNOOP aus einer Zytoplasmahaut (Dicke 170—290 Å).

Die Abgabe der Fettkugeln erfolgt bei der *Ratte* durch eine Abnabelung, bei der keine Zytoplasmawunde entstehen soll, die der Proteinpartikel dagegen anscheinend durch eine vorübergehend auftretende Öffnung von Vakuolen an der Zelloberfläche. HOLLMANN (1959) und WELLINGS, DE OME und PITELKA (1960) geben an, die Eiweißtröpfchen würden auch bei der *Maus* auf diese Weise aus der Zelle entlassen. Bezüglich weiterer Einzelheiten, z.B. der Rolle von Ergastoplasma und Golgiapparat bei der Milchsekretion, verweisen wir auf die zitierten Veröffentlichungen.

Mit der vorliegenden Studie äußern wir uns aus folgenden Gründen erneut zum Problem der Morphologie der Milchsekretion: 1. Zunächst erschien es uns trotz bestätigender Angaben von WELLINGS, DE OME und PITELKA (1960) wünschenswert, weitere Aufschlüsse über die Extrusion der Proteinteilchen aus den vakuolären Räumen in den Apices der Milchdrüsenzellen zu gewinnen, da sowohl BARGMANN und KNOOP (1959) als auch HOLLMANN (1959) unterstreichen, daß der Mechanismus dieses Vorgangs nicht voll befriedigend habe aufgeklärt werden können. 2. Weiterhin hielten wir es für notwendig, die Absonderung der Milchkügelchen erneut zu untersuchen. Während BARGMANN und KNOOP nämlich, wie erwähnt, die Abschnürung eines zartwandigen, mit einem Fetttropfen gefüllten Zytoplasmaballons beschreiben und auf diese Weise die Entstehung der seit langem bekannten Membran der Milchkügelchen verständlich machen,

\* Durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

\*\* Herrn Prof. Dr. MOTHES, dem Präsidenten der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, zum 60. Geburtstag gewidmet.

behauptet HOLLMANN (1959, 1960), die Passage der Fettkugeln in die Alveolenlichtung beruhe auf einer „effraction limitée de la membrane cellulaire sans perte sensible de matériel cytoplasmique“.

Da sich die Angaben HOLLMANNs auf Studien an der Glandula mammaria der *Maus*, die von BARGMANN und KNOOP auf solche an der Brustdrüse der *Ratte* stützen, untersuchten wir ebenfalls die Milchdrüse der *Maus*, außerdem die des *Goldhamsters*, um zu klären, ob den Verschiedenheiten der Aussagen etwa Unterschiede im Mechanismus der Milchabsonderung bei *Maus* und *Ratte* zugrunde liegen.

Außerdem ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß sich *beide* Vorgänge — nämlich jener der Zellruptur und jener der Abschnürung eines von einer Membran umschlossenen Fettkügelchens — bei der einen oder anderen Spezies nebeneinander abspielen. In diesem Zusammenhang sei der Satz von WELLINGS, DEOME und PITEK (1960) zitiert, der sich auf die Fettabgabe bei der *Maus* bezieht: „Fat droplets sometimes appeared to be extruded directly through the cell membrane, and, occasionally, droplets in the lumen were enclosed by membranes, which were interpreted as being derived from the plasma membranes of the secretory cells during the process of fat extrusion.“

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen an der Milchdrüse werfen erneut die Frage nicht nur der Gültigkeit des lehrbuchmäßigen Schemas der apokrinen Sekretion auf, sondern darüber hinaus des Wertes der Begriffe merokrine und holokrine Sekretion. Diese Frage wird in einem besonderen Kapitel behandelt (s. S. 563).

## II. Material und Methodik

*Lichtmikroskopische Untersuchungen.* Fixation der Milchdrüsen laktierender Goldhamster (2, Tötung 11 bzw. 13 Tage post partum) und weißer bzw. brauner Mäuse (3, Tötung 13 bzw. 15 Tage post partum) lebensfrisch in Osmiumsäure, Bouinscher Flüssigkeit, ferner in Formol (10%ig). Paraffineinbettung. Schnittdicke 6—8  $\mu$ . Färbungen: Hämatoxylin-Eosin, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, Azan (M. Heidenhain). Fettfärbung von Gefrierschnitten mit Scharlachrot.

*Elektronenmikroskopische Untersuchungen.* Die Gewebstückchen wurden in 2%iger isotonischer gepufferter Osmiumsäurelösung (pH -7,4) 3—4 Std lang bei Zimmertemperatur fixiert. Bei einem Teil der Präparate wurde der Fixationsflüssigkeit 1 bzw. 3% Makrodex-Substanz zugesetzt. Wir erhielten auf diese Weise bessere Ergebnisse, da der Makrodex-Zusatz das Auslaugen der Präparate im Alkohol und Methacrylat zumindest teilweise verhindert. Im Anschluß an die Fixierung wurden die Präparate gewässert. Entwässerung durch Äthylalkohol. Ein Teil der Präparate wurde 30 min lang in einer 0,5%igen Lösung von Phosphorwolframsäure in 90%igem Alkohol gefärbt. Einbettung in einem Gemisch aus Methacrylsäurebutylester und Methacrylsäuremethylester 9:1 bzw. in Vestopal W. Anfertigen der Dünnschnitte mit dem Porter-Blum-Mikrotom. Ein Teil der Blenden wurde mit einem zweiten Ploioformhäutchen versehen („Sandwich“). Alle Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Elmiskop I (Strahlspannung 80 kV) gemacht.<sup>1</sup>

## III. Befunde und Deutungen

### 1. Brustdrüse des laktierenden Goldhamsters

a) *Lichtmikroskopische Untersuchungen.* Die Brustdrüse des Goldhamsters zeichnet sich auf der Höhe der Laktation durch beträchtliche Erweiterung der Alveolen und Ausführungsgänge aus; die schmalen Bindegewebssepten enthalten

<sup>1</sup> Der Firma Knoll AG, Chemische Fabriken, Ludwigshafen a.Rh., sind wir für die Überlassung von Makrodex-Substanz und -Lösungen sehr zu Dank verpflichtet.

nur vereinzelte Fettzellen. Die Alveolen werden von einem einschichtigen, teils annähernd kubischen, teils stark abgeflachten Epithel mit entsprechend abgeplatteten Kernen ausgekleidet. Die Höhe des Drüsenepithels ist läppchenweise verschieden. Eine nicht geringe Zahl der meist kugeligen Zellkerne ist durch Fettvakuolen eingedellt. Das Bild von Kernvakuolen dürfte — wenigstens in vielen Fällen — durch Einschmiegen großer Fetttropfen in Kernbuchten zustande kommen (s. unten).

Die meisten der durch Herauslösung von Fetttropfen entstandenen großen Vakuolen liegen zwischen Kern und Basalmembran und im supranukleären Zellabschnitt, der vielfach eine große Blase lumenwärts vorwölbt. Von Vakuolen freie Strecken der Zelloberfläche lassen mitunter einen sehr niedrigen Härchenbesatz erkennen. Mit der Ölimmersion sind im Zelleib feine, fädige Gebilde deutlich auszumachen, die nicht selten parallel gelagert sind, vor allem in der Zellbasis; es handelt sich um Mitochondrien. Die Natur hier und da auftretender, unterschiedlich großer kugelig, oft in Gruppen in einer Vakuole liegender Zeileinschlüsse, die sich mit Azokarmin dunkelrot und mit Chromalaunhämatoxylin blauschwarz färben, ist unklar. Auffallend helle, mit dunklen länglichen Kernen ausgestattete Zellen innerhalb des Epithels sprechen wir als Myoepithelzellen an.

In den Lumina der Alveolen befindet sich ein schwach azidophiles, feinkörniges Gerinnsel, das ausgelaugte, von einer Membran begrenzte Milchkügelchen und mitunter Gruppen abgestoßener vakuolisierter, zerfallender Zellen enthält.

**b) Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Drüsenzellen.** Die einer dünnen Basalmembran aufsitzenden Epithelzellen der Alveolen (Höhe 3—11  $\mu$ ) enthalten teils abgerundete, teils mit gelegentlich ziemlich tiefen Einbuchtungen und Einkerbungen versehene Kerne, deren Chromatin nahe der Kernmembran verdichtet ist. Der lumennahe Bereich der Zellgrenzen ist mit schwach ausgeprägten *Schlußleisten* („terminal bars“) ausgestattet. Von der freien Oberfläche des Zelleibes erheben sich in Abständen von 150—500  $m\mu$  Mikrovilli, die eine Länge von 1  $\mu$  erreichen können. Gegabelte *Mikrovilli* sind nicht selten zu beobachten. Flachschnitte durch den Zöttchenrasen lassen erkennen, daß auf 1  $\mu^2$  etwa 10 bis 20 Zytoplasmafädchen entfallen können. Die Größe der zahlreichen, verhältnismäßig massendichten *Mitochondrien* (Crista-Typus) schwankt beträchtlich. Es wurden Durchmesser von 500—750  $m\mu$  und Längen von 1000—2200  $m\mu$  gemessen. Das *Ergastoplasma* erscheint in Form eng benachbarter, einander paralleler, mit Ribosomen (Paladegranula) besetzter Membranen, die sich von der Zellbasis bis zum Apex erstrecken können, wo sie zum Teil parallel zur Zelloberfläche ausgerichtet sind. Im basalen Zellabschnitt kommen Erweiterungen der intermembranösen Räume des Ergastoplasmas zu engen Zisternen vor. Die Mitochondrien werden sehr häufig von konzentrisch angeordneten Ergastoplasmaschalen umgeben. Die Strukturdicke des Grundplasmas beruht auf der gleichmäßigen Verteilung feinsten Granula von der Größe der Ribosomen.

*Fetteinschlüsse* verschiedenen Kalibers können in allen Abschnitten der Epithelzelle angetroffen werden. In unserem Material treten sie meistens zwischen Kern und Zelloberfläche auf. Da einige der Fetttropfen tiefe Kernbuchten ausfüllen, kann bei entsprechender Schnittrichtung das Bild eines intranukleären Fetteinschlusses vorgetäuscht werden. Das Vorkommen kleiner intranukleärer, d.h.



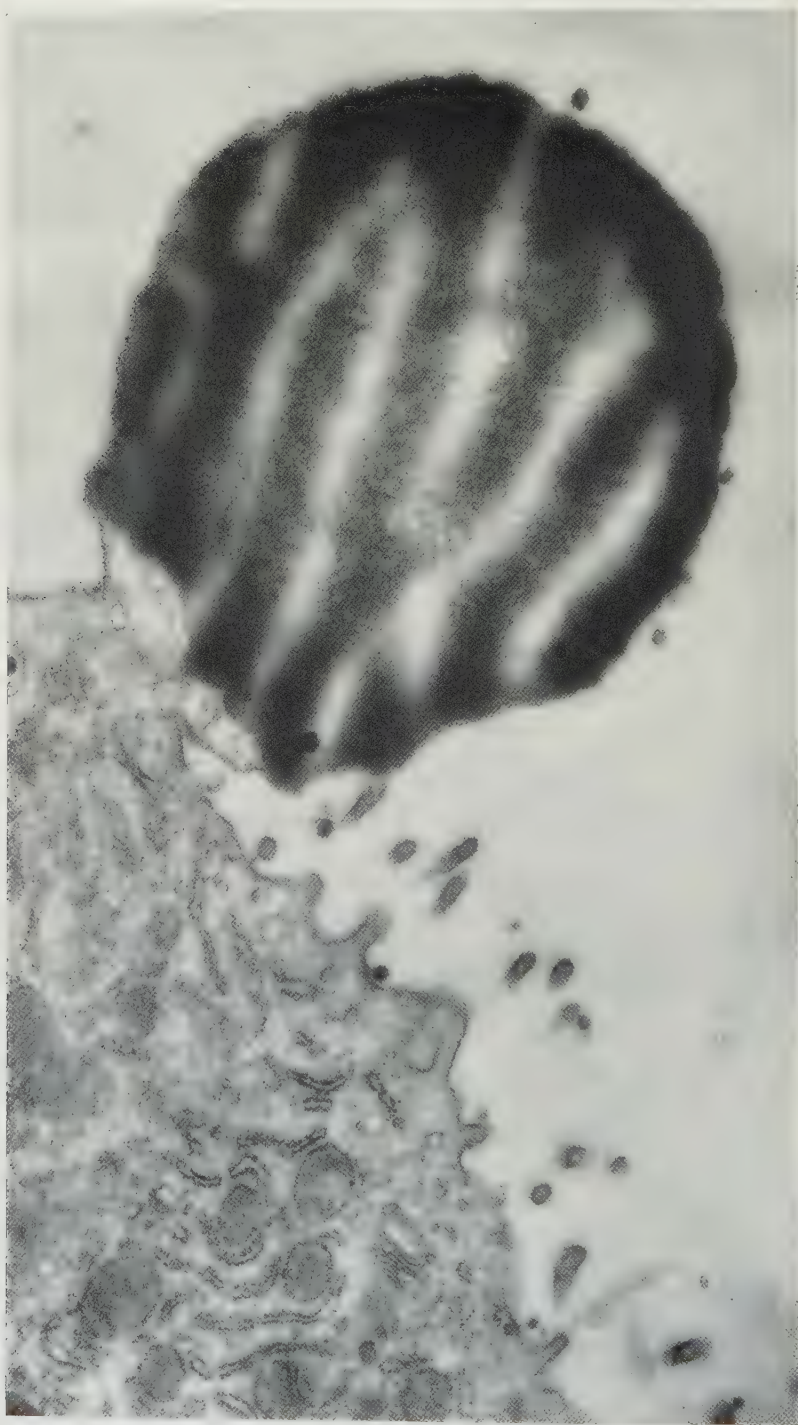


Abb. 1. In Abschnürung begriffenes Milchfettkügelchen, von Membran umhüllt. Laktierende Brustdrüse des Goldhamsters. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 21 000fach

inmitten des Karyoplasmas gelegener Fetteinschlüsse (EHRENBRAND und LINDNER 1959) soll mit dieser Feststellung nicht bestritten werden; indessen ist es nach unseren Feststellungen selten.

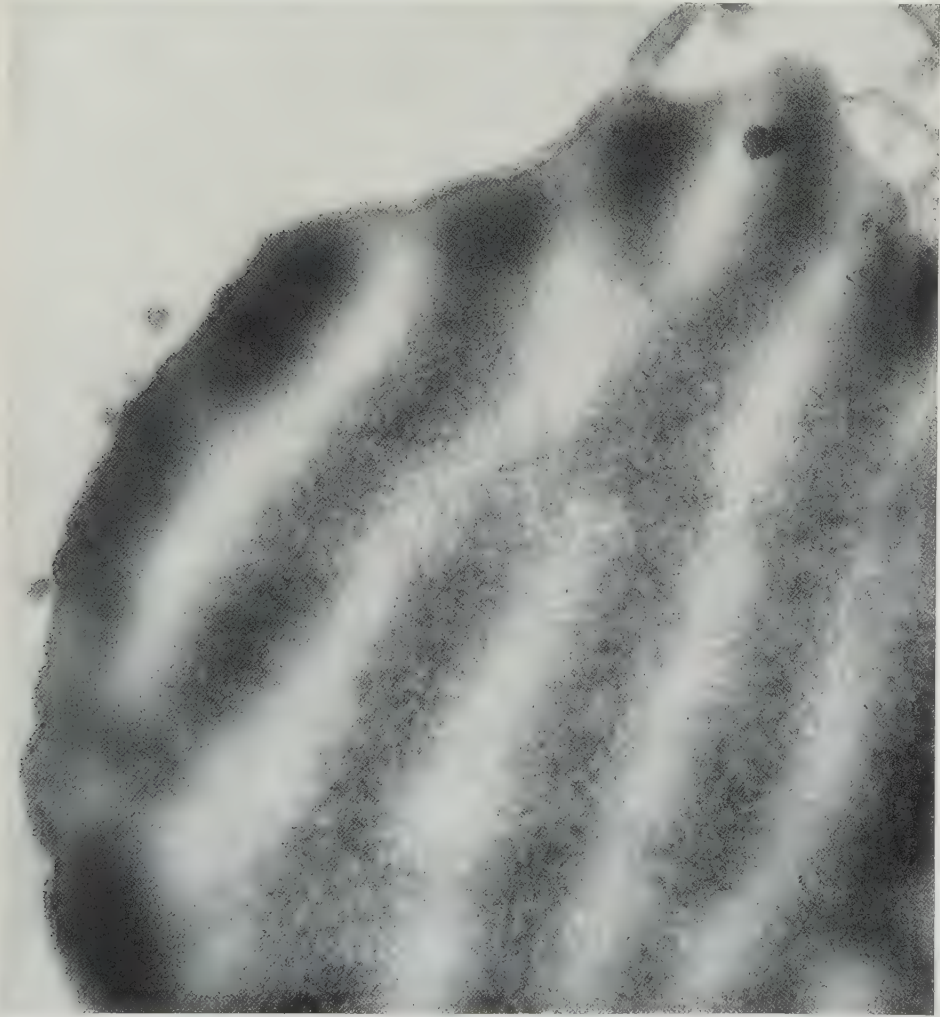


Abb. 2. Teil des in Abb. 1 wiedergegebenen MilCHFettkügelchens. Beachte die Membran. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 40 000fach, zur Reproduktion verkleinert

Das Aussehen der Fetteinschlüsse wechselt je nach dem Grad der Herauslösung der Fettstoffe zwischen dem einer gleichmäßig massendichten kugeligen oder zackigen Bildung und einer von zartem Gerinnsel erfüllten Blase. In manchen Fällen erscheint die Randzone der Fetteinschlüsse dicht, das Zentrum aufgelockert. Apikal gelegene Fetttropfen, die nur noch von einer dünnen Zytoplasmachale überzogen sind, können sich weit in die Lichtung der Endstücke vorwölben (Abb. 1, 2). Zustandsbilder wie das in Abb. 3 wiedergegebene dürften durch das Einsinken des Tropfens nach Herauslösung von Fett entstehen und somit ein

Artefakt darstellen. Dieses Bild ist jedoch insofern aufschlußreich, als es die engen Nachbarbeziehungen zwischen Ergastoplasma und Fetteinschlüssen erkennen läßt, auf die BARGMANN und KNOOP (1959) abheben.

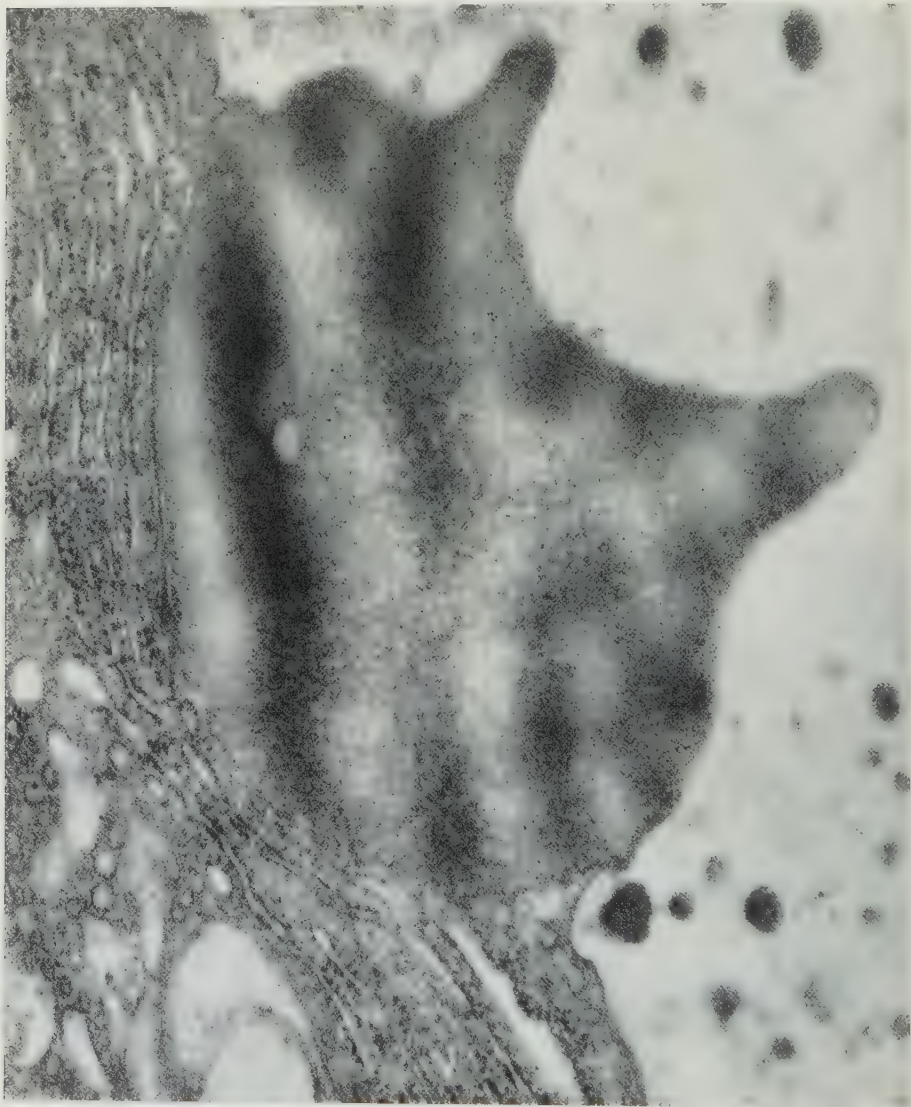


Abb. 3. Apikal gelegener, von Ergastoplasma unterlagert Fetttropfen in einer Milchdrüsenzelle des Goldhamsters. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 58 000fach, zur Reproduktion verkleinert

Das Bild eines Übertretens von Fetttropfen in die Alveolenlichtung unter Freilegung des Zytoplasmas durch eine Ruptur des Plasmalemmis, wie HOLLMANN sie für die *Maus* annimmt, haben wir beim *Goldhamster* in keinem Falle erhalten. Fände die Abgabe der Milchkügelchen auf eine derartige Weise statt, dann wäre die Tatsache unerklärlich, daß die intraalveolären Fettkugeln (Durchmesser 300—430 m $\mu$ ) stets von einer Zytoplasmahülle umschlossen sind. Die Dicke



dieser zytoplasmatischen Membran beträgt 200—250 Å; die Fettkugelmembran ist demnach dicker als das Plasmalemm. Hier und da stößt man auf Membran-

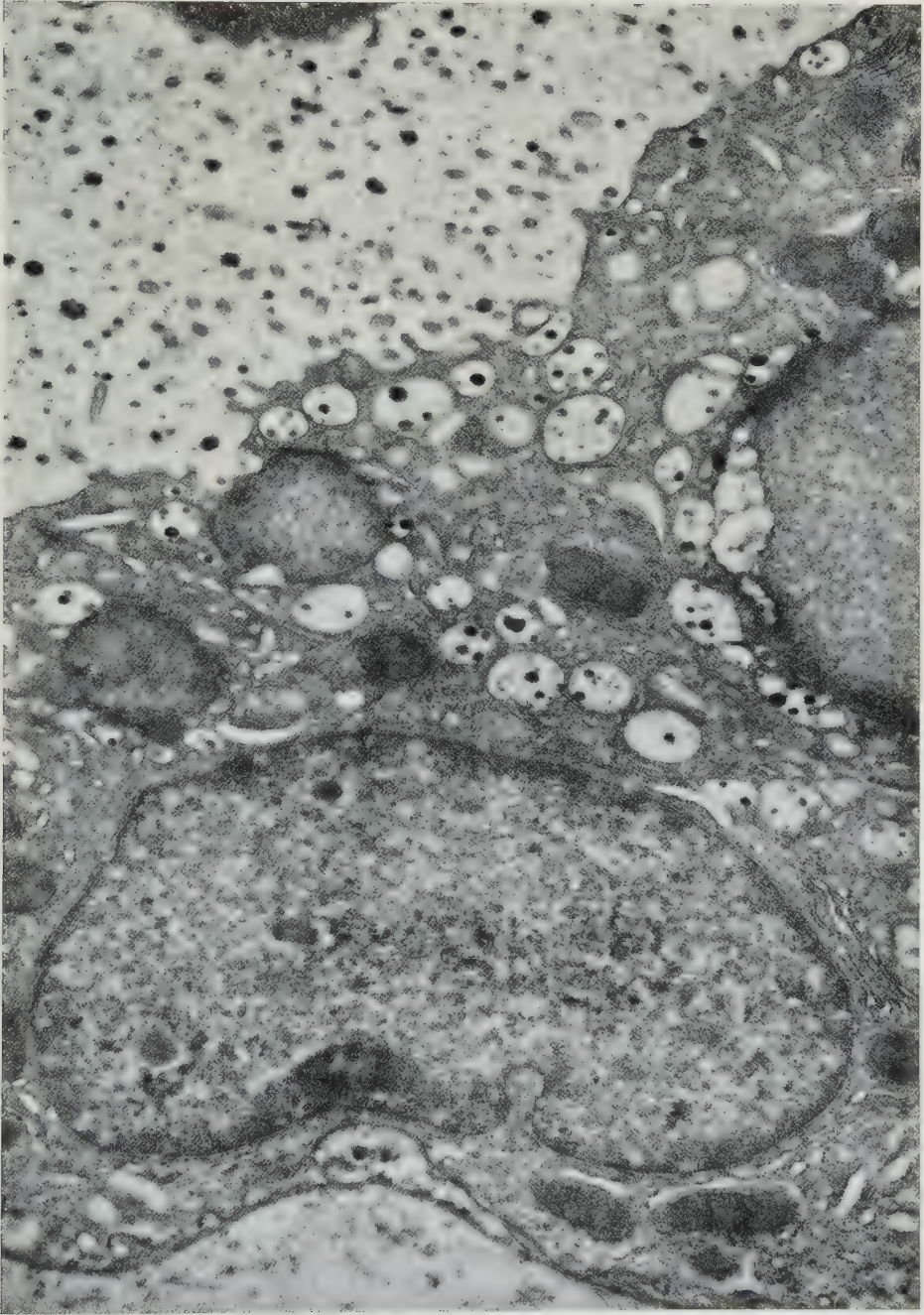


Abb. 4. Milchdrüsenzelle vom Goldhamster mit zahlreichen Vakuolen im apikalen Zellabschnitt, die Proteingranula enthalten. Elektronenmikroskopische Aufnahme, 17 000fach vergrößert, zur Reproduktion verkleinert

partien, die noch dicker sind als soeben angegeben und eine Zytoplasmastruktur deutlich erkennen lassen. Wir fanden bisher mit Hilfe des Elektronenmikroskopes keine Hinweise auf die intraalveoläre Anlagerung einer Hüllschicht an die Oberfläche eines membranlosen Fetttropfens.

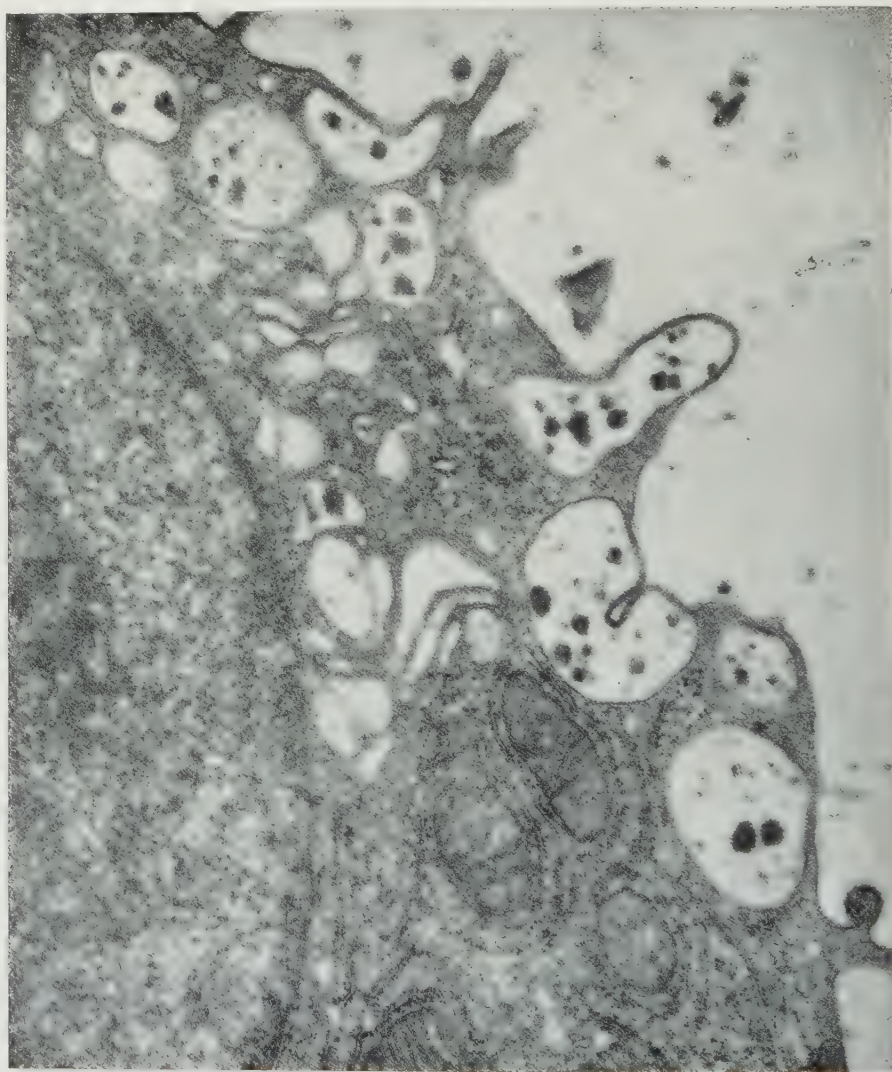


Abb. 5. Proteingranula enthaltende Vakuolen im apikalen Abschnitt der Milchdrüsenzelle des Goldhamsters. Links Anschnitt des Zellkernes. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 37 000fach, zur Reproduktion verkleinert

Auf die Frage, auf welche Weise die membranumhüllten Milchkügelchen geboren werden, dürfte die Abb. 1 Antwort geben. In ihr ist nach unserer Auffassung die Phase der Abnabelung (pinching off) eines apikal gelegenen Fetttropfens festgehalten.

Mehr oder weniger massendichte kugelige Granula der gleichen Beschaffenheit wie die im Endstücklumen gelegenen *Proteinkörnchen* trifft man im Zelleib



innerhalb zahlreicher scharf begrenzter, kugelig oder ovoider *Vakuolen* (Durchmesser 2500—7000 Å) an. Diese Vakuolen liegen vorzugsweise im apikalen Zellabschnitt (Abb. 4, 5). Die Durchmesser der Körnchen betragen in der Regel 950—1800 Å, d.h. die Mehrzahl der intravakuolären Granula besitzt dieselbe Größe wie die frei im Milchplasma verteilten Proteinpartikel. Kleinere, weniger dichte Teilchen innerhalb der Blasen dürften, wie DEOME et al. beschrieben haben, Vorstufen dieser Körnchen darstellen.

Ebenso wie die Fetttropfen geraten auch die mit Granula gefüllten Vakuolen unter Größenzunahme in die Nähe des apikalen Plasmalemm. Hier können sie

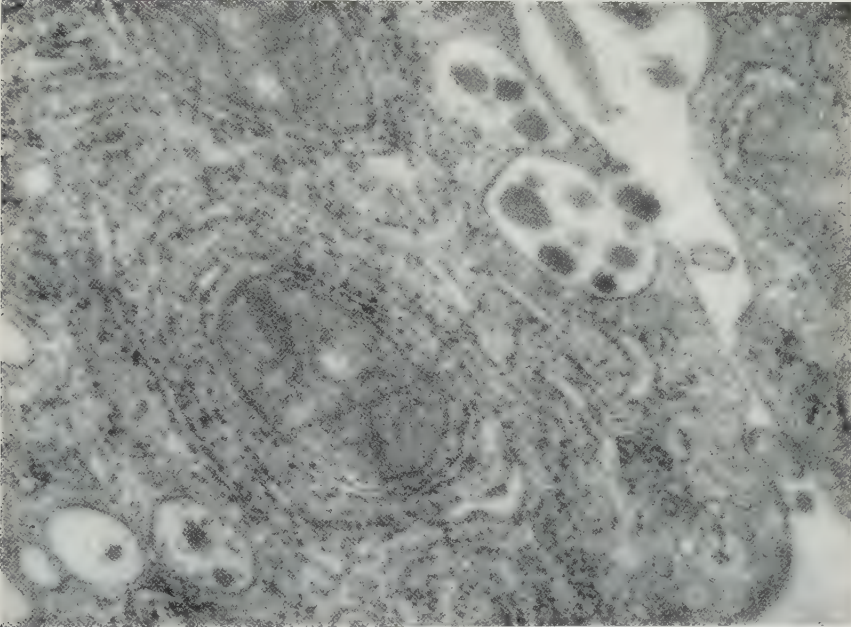


Abb. 6. Vakuole mit Proteingranula, sich in die Alveolenlichtung öffnend (Milchdrüse des Goldhamsters). Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 40 000fach

sich ballonartig vorwölben (Abb. 5). Eine Abnabelung granulahaltiger Vakuolen, vergleichbar der Abgabe von Milchkügelchen, wurde nicht festgestellt. Im Falle einer solchen Abnabelung müßten viele Vakuolen mit Inhalt oder geplatzte und entleerte Bläschen im Milchplasma gefunden werden. Soweit sie dort überhaupt vorkommen, stammen sie aus in den Alveolen zerfallenden Epithelzellen, deren stabile Zytomembranen und von Ergastoplasmaschalen umhüllte Mitochondrien sich gleichfalls im Milchplasma verteilen. Teilweise handelt es sich auch um tangential zur Zelloberfläche gerichtete Anschnitte in die Lichtung vorgebuckelter Vakuolen. Abb. 6 spricht dafür, daß die Vakuolen ihren Inhalt durch kleine, vorübergehend auftretende Öffnungen nach außen entleeren, wie dieses auch von WELLINGS, DEOME und PITELKA (1960) auf Grund ähnlicher Beobachtungen an der Maus angenommen wird.

In unmittelbarer Nachbarschaft der geschilderten Vakuolen findet man kleinere und größere, oft sackartig erweiterte Räume, die gleichfalls von glatten Membranen begrenzt sind, jedoch lediglich ein verwaschenes Gerinnsel enthalten oder elektronenmikroskopisch leer erscheinen. Diese Gebilde kommen ebenso



wie die mit Granula beladenen Vakuolen in innigem Zusammenhang mit dem Golgiapparat vor (Abb. 7), dessen Membranstapel im supranukleären Zellabschnitt liegen. Aus diesem Grunde sind wir im Einklang mit unseren früheren Beobachtungen (BARGMANN und KNOOP 1959) und den Angaben von HOLLMANN (1959) der Auffassung, daß der Golgiapparat im Dienste der Kaseinbildung steht.

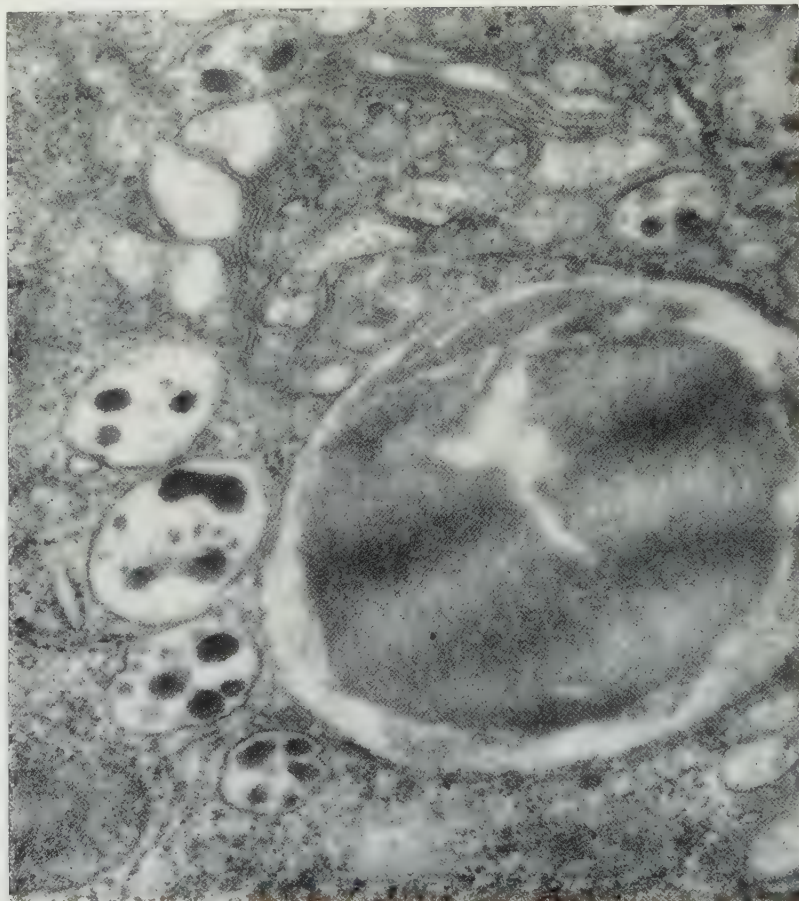


Abb. 7. Großer Einschuß in Milchdrüsenzelle des Goldhamsters. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 40 000fach

Auf die Frage nach dem Ort der primären Ausarbeitung der Kaseingranula geben unsere elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Milchdrüse des Goldhamsters jedoch keine Antwort.

Die bisherigen Veröffentlichungen berichten ebenso wie die vorliegende Studie über die Tatsache, daß die in Rede stehenden Vakuolen weite Lichtungen besitzen und nur teilweise von Kaseinpartikeln eingenommen werden. Bisher wurde von einer Deutung dieses Tatbestandes abgesehen, und sie kann auch jetzt nicht in befriedigender Form vorgelegt werden. Indessen muß daran erinnert werden, daß die Milchdrüsenzelle nicht nur der Produzent geformter Sekrete — der Milchkugeln und Kaseingranula — ist, sondern auch des *Milchplasmas*. Das

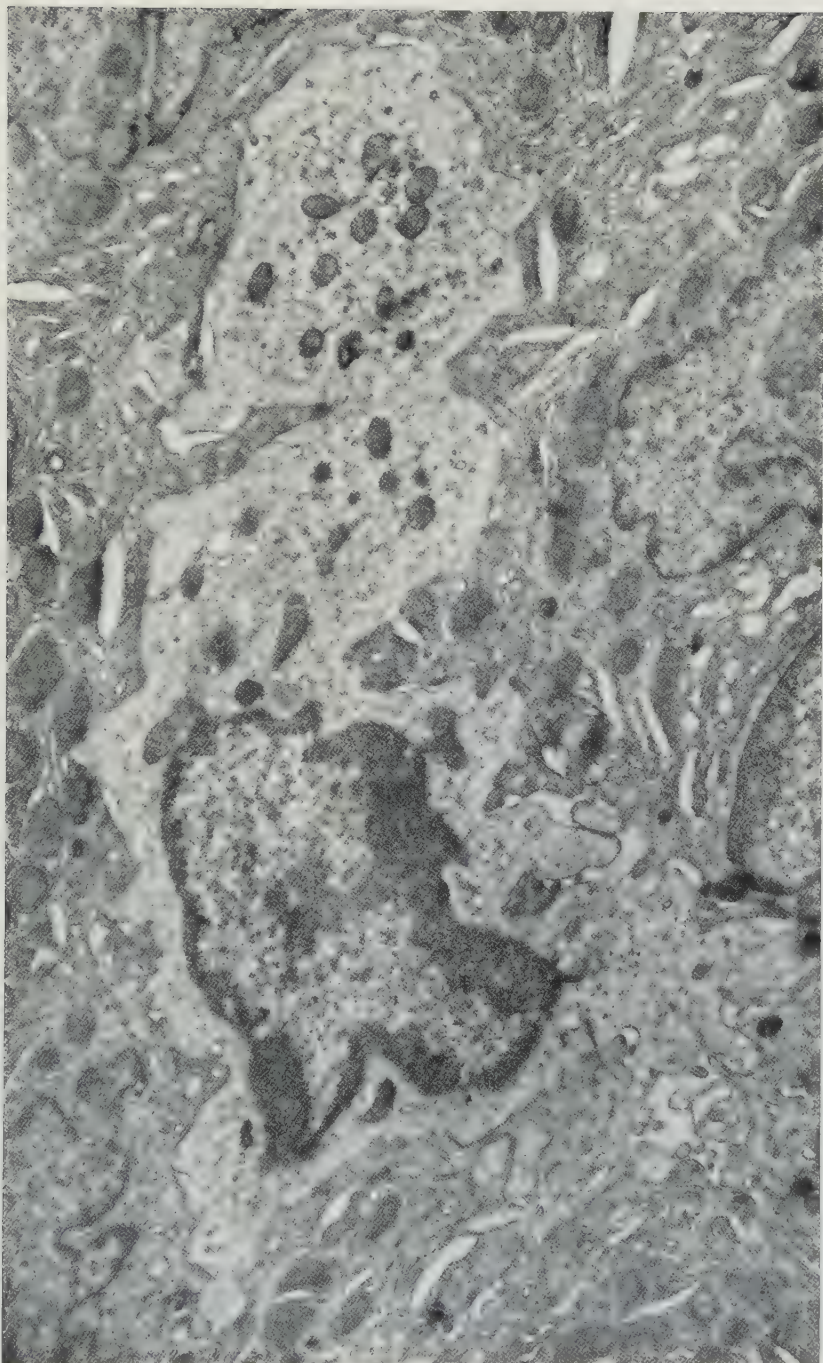


Abb. 8. Myoepithelzelle (Flachschnitt) im Epithel der Milchdrüse des Goldhamsters. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 14000fach, zur Reproduktion verkleinert



elektronenmikroskopische Äquivalent dieser Flüssigkeit ist vermutlich jene in Form zartester Gerinnsel abbildbare Substanz, die sich in der Umgebung der Eiweißgranula innerhalb der relativ weiten Vakuolen befindet (Abb. 7).

Den obenerwähnten gröberen, lichtmikroskopisch sichtbaren Granula (S. 547) dürften größere, aus vielen Partikeln verschiedener Größe und Dichte bestehende rundliche Komplexe entsprechen, innerhalb deren vakuoläre Räume verschiedenen Durchmessers auftreten können. Auch kompakte kugelige Einschlüsse vom Typ der in Abb. 7 wiedergegebenen sind nicht selten, ferner an Myelinfiguren erinnernde Strukturen. Es fällt auf, daß größere Einschlüsse in großer Zahl vornehmlich in Zellen mit hellem Zytoplasma vorkommen; in einem Teil der Fälle scheint es sich um Myoepithelzellen zu handeln. Möglicherweise sind die soeben beschriebenen Bildungen Ausdruck degenerativer Vorgänge.

*Myoepithelzellen.* Die meist zwischen Basalmembran und Drüsenepithel gelegenen Myoepithelzellen heben sich auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen als helle, unregelmäßig geformte Elemente deutlich von den weitaus dichter strukturierten Drüsenzellen ab (Abb. 8). Ihre vielfach stark gefalteten Kerne pflegen Verdichtungen des Chromatins in der Peripherie des Kernraumes aufzuweisen. Die Zellen sind durch kleinere Fortsätze mit den Elementen der Umgebung verhakt und verzahnt. Ergastoplasma und Golgimembranen haben wir auf unseren Aufnahmen nicht beobachtet. Die Zahl der bemerkenswert kleinen, kugeligen bis ovoiden Mitochondrien ist gegenüber jener in den Drüsenzellen gering. Parallel verlaufenden Strähnen von sehr zarten Myofilamenten begegnet man in den zum Teil kräftigen Ausläufern, die sich der Basalmembran anlagern.

## 2. Brustdrüse der laktierenden Maus

a) **Lichtmikroskopische Untersuchungen.** Die Brustdrüse der laktierenden Maus bietet insofern ein individuell wechselndes Strukturbild, als sie bald durch breitere Züge von Bindegewebe mit zahlreichen univakuolären Fettzellen, bald durch schmale Bindegewebssepten mit vereinzelt Fettzellen, darunter plurivakuolären Elementen, mehr oder weniger deutlich in Läppchen gegliedert wird. Das von uns untersuchte Material zeichnet sich durch weite Gänge und Alveolen aus, die zahlreiche große, kugelförmige Fetttropfen inmitten geronnenen Milchplasmas enthalten. Einzelne Milchkügelchen lassen eine im Schnitt sichelförmig erscheinende Zytoplasmakalotte erkennen. Das Epithel der Endstücke ist teils kubisch, teils abgeflacht. Im Zytoplasma der Drüsenzellen treten zahlreiche, durch Osmiumsäure geschwärzte Fetttropfen hervor, deren kleinste in den dichtstrukturierten basalen Zellabschnitten liegen. Diese Feststellung steht mit den bereits früher an der Milchdrüse der Ratte erhobenen Befunden in Einklang, die für eine Entstehung des Milchlippes außerhalb des Bereiches der Golgizone, d.h. im Ergastoplasma sprechen. Tröpfchen mittlerer Größe, mitunter parallel zur Zelloberfläche aufgereiht, erkennt man im apikalen Zellteil, die größten wölben sich weit in die Alveolenlichtung vor; im Hämatoxylin-Eosin-Präparat erscheinen sie in Form optisch leerer Blasen, die durch eine äußerst zarte Membran vom Drüsenlumen geschieden sind.

Bei einem der untersuchten Tiere lag eine akute Mastitis vor, wie sie bei Nagern häufiger beobachtet werden kann. Ausführungsgänge und Alveolen eines Organabschnittes enthalten große Massen von Granulozyten in allen Stadien der Phagozytose von Drüsensekret, des



Kern- und Zellzerfalles. Allenthalben stößt man auf Leukodiapedese im Epithel; entsprechend finden sich im Interstitium zahlreiche weiße Blutzellen. Azidophile körnige Einschlüsse im Zytoplasma der Alveolenzellen dürften Eiweißpartikel abnormer Größe darstellen. Intraepitheliale Fettvakuolen sind überall vorhanden, doch finden sich kaum freie intraalveoläre Milhfettkügelchen.

**b) Elektronenmikroskopische Untersuchungen. Drüsenzellen.**

Auch die Drüsenzellen der Glandula mammaria der Maus, deren Kerne deutliche Nukleolen und gelegentlich vereinzelte, optisch leere Vakuolen (Fett? Durchmesser 2000 Å) enthalten, zeichnen sich durch ein sehr dicht strukturiertes Zytoplasma aus, aus dem sich zahlreiche Mikrovilli in die Alveolenlichtung erheben. Die Länge der *Mikrovilli* — unter ihnen befinden sich gegabelte Formen — beträgt rund 6000 Å, ihre Dicke 1000—1250 Å. Auf 1  $\mu^2$  entfallen durchschnittlich 25 Mikrovilli; die für Resorptionsprozesse (Rückresorption, Azimov 1959) zur Verfügung stehende Oberfläche (Abb. 9) ist also beträchtlich. Der Zelleib wird von zahlreichen, verhältnismäßig kleinen rundlichen *Mitochondrien* ziemlich gleichmäßig durchsetzt. Ribosomen (Paladegrana) sind teils diffus im Grundplasma verteilt, teils an die oft parallel zueinander ausgerichteten Membranen des *Ergastoplasmas* gebunden. Die Ergastoplasamembranen lassen sich bis in den apikalen Zellbereich hinein verfolgen, wo sie nicht selten kleine, oft rundliche Räume begrenzen; derartige Bildungen befinden sich jedoch auch im basalen Zellabschnitt. Gruppen

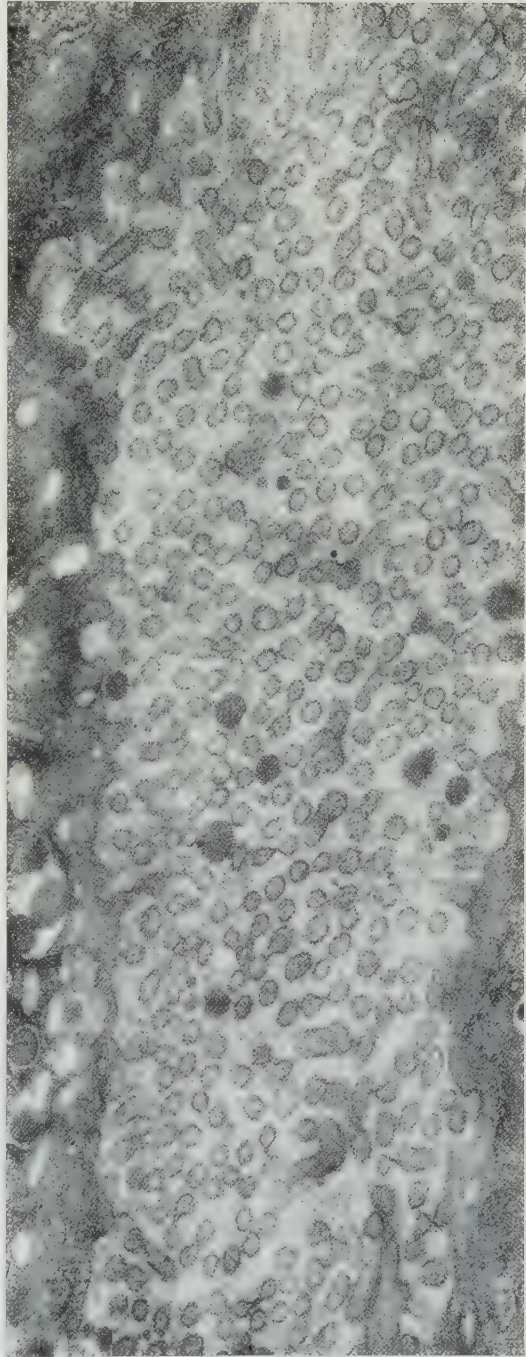


Abb. 9. Tangentialschnitt durch den Mikrovilli-Rasen. Laktierende Brustdrüse der Maus. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 36000fach, zur Reproduktion verkleinert

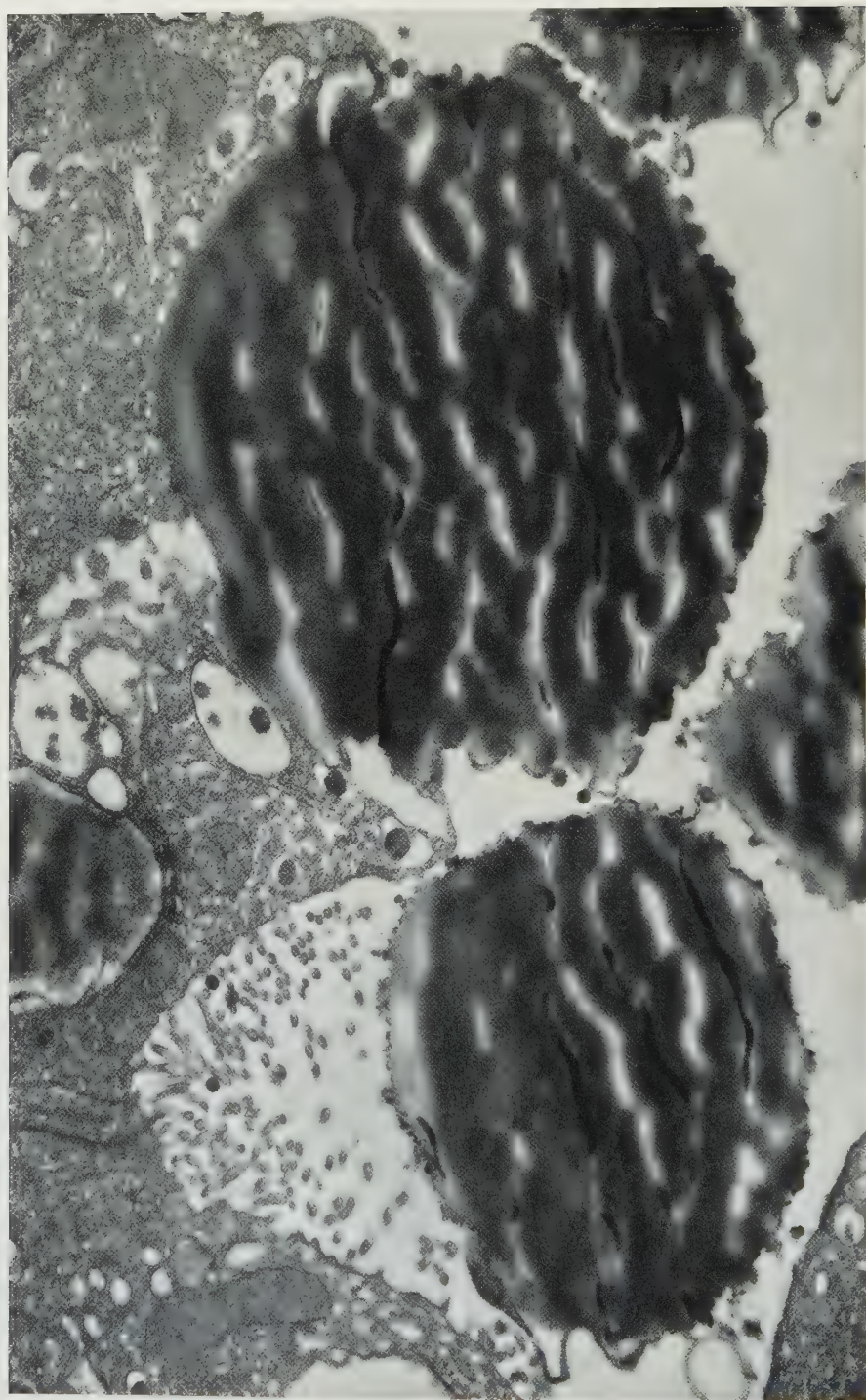


Abb. 10. Milchdrüsenepithel der Maus mit Fettkügelchen. Oberes Kügelchen noch in Verbindung mit der Drüsenzelle, unteres frei im Lumen liegend. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 14 200fach, zur Reproduktion verkleinert



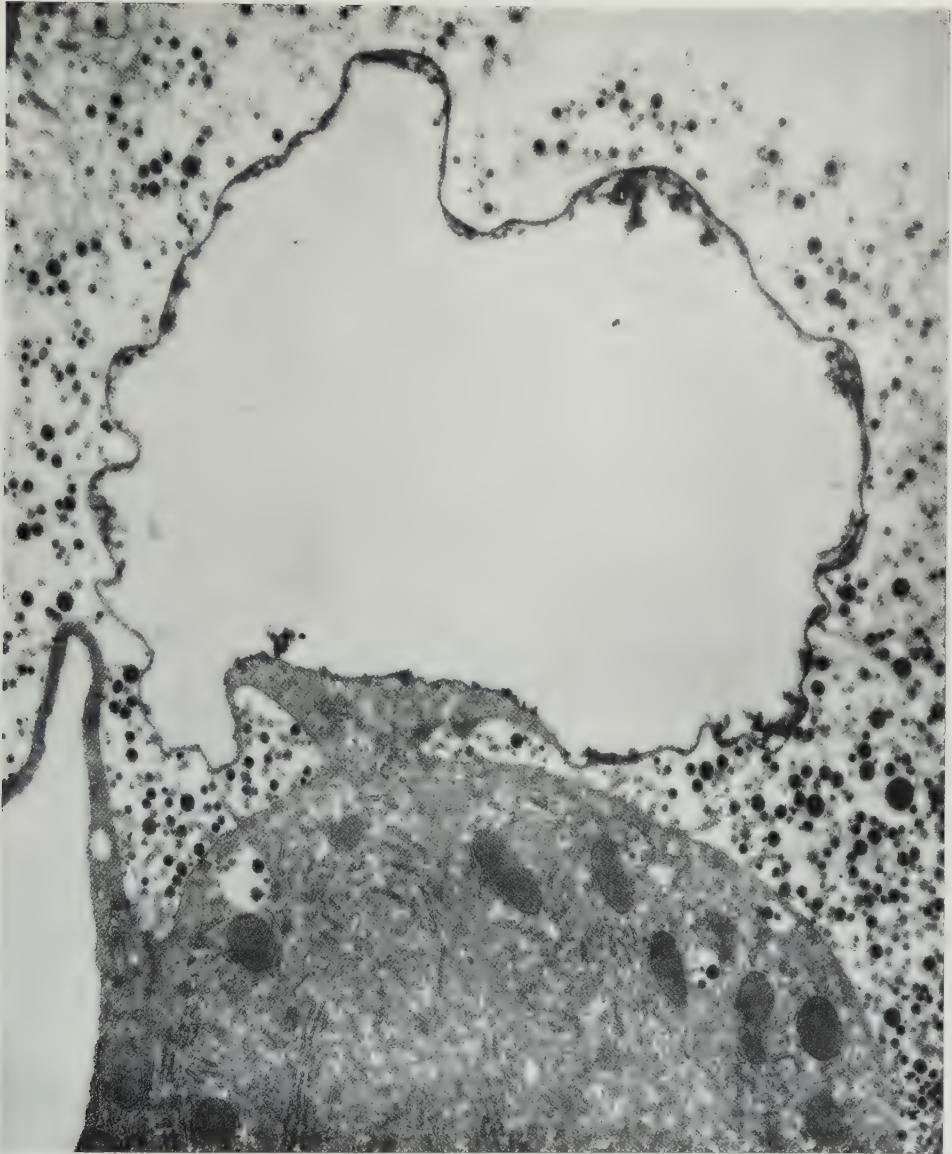


Abb. 11. Ausgelaugtes Milchfettkugelchen in der Brustdrüse der Maus, noch mit Drüsenzelle verbunden. Frei im Lumen zahlreiche Proteingranula. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 7000fach, zur Reproduktion verkleinert

zum Teil flacher, zum Teil sackartig erweiterter Räume des Golgiapparates liegen teils paranukleär, vor allem aber in der supranukleären Region. Ihre Lichtungen sind vielfach optisch leer, in anderen Fällen enthalten sie ein locker verteiltes zartes Gerinnsel in Begleitung kugeliger Partikel, deren Form, Größe und Dichte jener der im Lumen der Alveolen befindlichen *Proteinpartikel* entsprechen. Der Durchmesser dieser Teilchen liegt bei 1000—2500 Å, d.h. etwa in der Größenordnung der früher für Proteinteilchen der Rattenmilch angegebenen Werte.



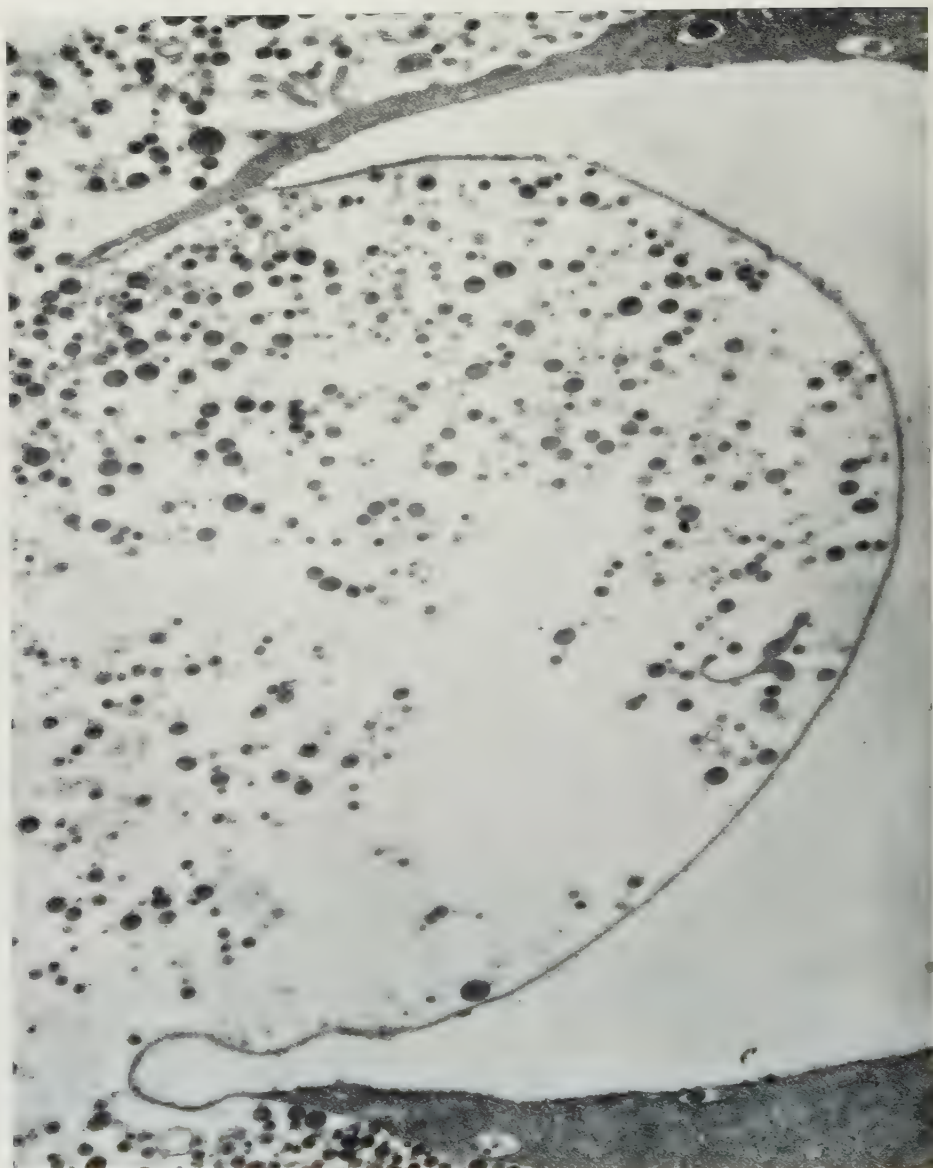


Abb. 12. Ausgelaugtes Milchfettkügelchen (Brustdrüse der Maus), dessen ursprünglich in das Alveolenlumen vorgewölbte Kuppe schalenartig eingesunken ist. In die so entstandene Mulde ist Sekret mit Proteingranula eingeströmt. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 17 500fach, zur Reproduktion verkleinert

Einzelne Proteingranula befinden sich in engen, dem Plasmalemm benachbarten ovoiden Räumen, die vermutlich Abgliederungen des Golgiapparates darstellen, der vielfach ausgesprochen nahe der Zelloberfläche angetroffen wird. Vakuolengruppen, die Eiweißteilchen enthalten, sind häufig an der Basis von Fetteinschlüssen festzustellen, die sich in die Endstückrichtung vorwölben. Da Körnchengruppen in lakunenartigen Einsenkungen der Zelloberfläche vorkommen,

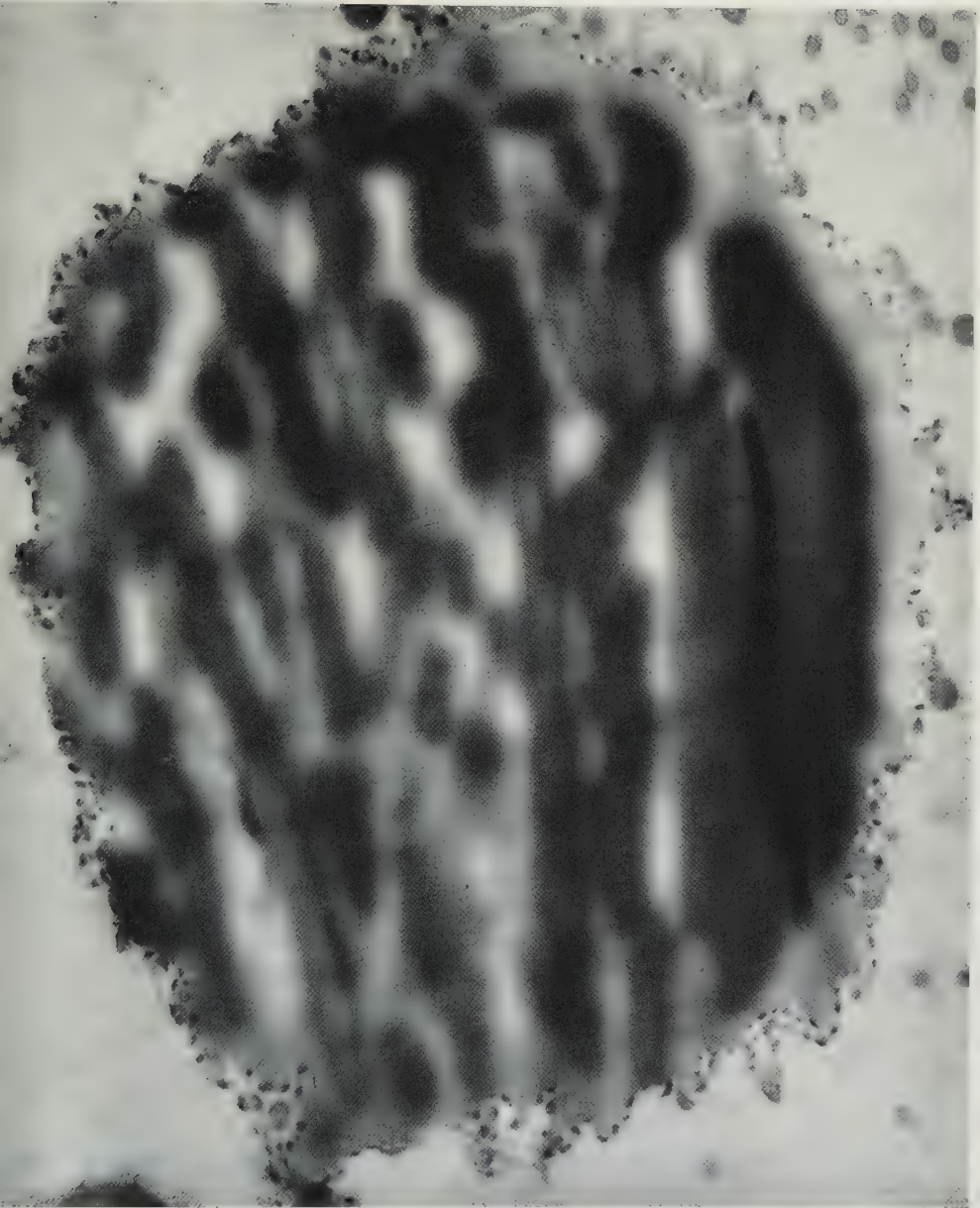


Abb. 13. Isoliertes MilCHFettkügelchen (Maus) mit Membran. In der gerunzelten Hülle Fettstippchen. Elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergr. 26 000fach, zur Reproduktion verkleinert

ist anzunehmen, daß die Entleerung der Kasein granula bei der Maus in der gleichen Weise vonstatten geht, wie dies bereits von BARGMANN und KNOOP, HOLLMANN sowie WELLS, DEOME und PITEKA beschrieben wurde.

Über das Verhalten der *Fetteinschlüsse* im Zytoplasma der Milchdrüsenzelle der Maus, die nach unseren Beobachtungen bei der Präparation leichter ausgelaugt

werden als die von Ratte und Hamster, geben die von uns gewonnenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen folgende Aufschlüsse: In der Zellbasis findet man in Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopischen Präparat kleine, mit netzigem Gerinnsel gefüllte Vakuolen, die von Ergastoplasma umgeben sind; in ihrer Nähe pflegen Mitochondrien zu liegen. Mittelgroße und große Fetttropfen befinden sich im Zellapex. Zwischen Kernregion und großen Fettkugeln sieht man häufig Komplexe von Ergastoplasma. Beziehungen der Fetteinschlüsse zum Golgiapparat ließen sich dagegen in keinem Falle feststellen. Die apikal gelegenen Tropfen sind teils als Ganzes erhalten (Abb. 10), teils nur bis auf einen zentral gelegenen Rest, teils völlig aufgelöst (Abb. 11); in letzterem Falle erkennt man nicht selten bröckelige osmiophile Beläge an der Innenfläche der Vakuolen.

Die größten Fetttropfen, für deren Entstehung durch Konfluenz kleiner Fettkugeln bisher keine Anhaltspunkte gewonnen wurden, buckeln die apikale Zelloberfläche erheblich in die Alveolenrichtung vor, wobei es zu einer beträchtlichen Verdünnung des apikalen Zytoplasmaüberzuges kommt. Die weit vorspringenden Fetteinschlüsse, die durch verhältnismäßig schmale Zytoplasmasockel mit dem Zelleib verbunden sind, findet man allenthalben von einer Membran umschlossen (Abb. 10, 11). Infolge der Herauslösung des Fettes aus derartigen Ballons haben viele dieser Bildungen ihre pralle Form verloren. Teils kommt es bei unvollständiger Fettlösung zu einer feinen Runzelung des apikalen Zytoplasmafilms, der sich dann stellenweise vom Blaseninhalt abhebt, in anderen Fällen, nämlich bei völliger Lösung des Fettkügelchens, ist die entleerte Blase zum Zellinneren hin eingesunken (Abb. 12) oder in gröbere Falten gelegt. Gerade an den eingedellten Zellapices, aus denen das Fett in einem Falle mehr, im anderen weniger ausgiebig herausgelöst wurde, bietet sich mitunter das Bild der Fettaus-schleusung unter Ruptur der Zellmembran; letztere ragt dann gelegentlich in Fetzen in die Alveolen hinein. Wir hegen wenig Zweifel daran, daß eine derartige Extrusion unter Bersten des apikalen Plasmalemmis in diesen Fällen durch Artefakte vorgetäuscht wird, da entsprechende Bilder am häufigsten an solchem Material gesehen wurden, das den Eindruck mechanischer Schädigung macht.

Zugunsten dieser Ansicht spricht unseres Erachtens das Verhalten der frei in der Lichtung der Endstücke inmitten der dichtgedrängten Kaseinteilchen liegenden Milchkügelchen. Die in die Alveolenrichtung gelangten Milchkügelchen treten nämlich nicht in Form von puren Fetttropfen auf, sondern sind wie die Milchkügelchen von Ratte und Hamster durch eine Membran scharf vom umgebenden Sekret geschieden (Abb. 13). Dicke und Struktur der Membran freier Milchkügelchen entsprechen jener der teils vorgebuckelten, teils eingesunkenen apikalen Membran, die noch mit der Mutterzelle verbunden ist. Mitunter sind die Hüllen an einer Stelle durch flache, mitabgegebene Zytoplasmakalotten verdickt (s. auch S. 556). Eine nicht selten zu beobachtende starke, vielfach nur streckenweise auftretende Osmiophilie der Hüllen beruht möglicherweise auf Imbibition durch das im übrigen durch Lösung verschwundene Fett.

*Myoepithelzellen.* Den bisher bekannten Daten über die *Myoepithelzellen* haben wir keine neuen Befunde hinzuzufügen.

*Leukozyten.* Als Nebenfund, der an einer *entzündlich erkrankten Brustdrüse* (s. S. 556f.) erhoben wurde, sei das Auftreten zahlreicher neutrophiler Granulocyten in den Alveolarlichtungen erwähnt, die sowohl zahlreiche *Kaseinpartikel* als auch *Milchfettkügelchen* phagozytiert haben.



#### IV. Über die Begriffe „merokrine“, „apokrine“ und „holokrine Sekretion“

Im Anschluß an die Bemerkung von BARGMANN und KNOOP (1958), es sei angesichts der an der Brustdrüse erhobenen Befunde fraglich, ob die üblichen Lehrbuchschemas über den Mechanismus der exokrinen Sekretion weiterhin Geltung beanspruchen können, scheinen uns nunmehr einige grundsätzliche Ausführungen über die Begriffe merokrine, apokrine und holokrine Sekretion am Platze zu sein. Wir gehen dabei von den Darstellungen aus, die in einer Reihe bekannter Lehrbücher enthalten sind.

Nach COPENHAVER und JOHNSON (1958) ist die Mehrzahl der Drüsen merokrin. „The secretion is a product of the cell but the cell itself is not extruded with the secretion“ (S. 304). Bezüglich des holokrinen Typs der Sekretion heißt es im Hinblick auf das Beispiel der Talgdrüse: „Entire cells laden with secretory material are extruded as the secretion.“ Die apokrine Sekretion ist nach den Autoren als ein „intermediate type of secretion“ anzusehen. Sie spiele sich, z.B. an der Zelle der Milchdrüse, folgendermaßen ab: „During periods of marked activity the apical ends of these cells with their accumulated secretory materials are sometimes broken off to form a part of the secretion.“ Diese Darstellung entspricht der auf SCHIEFFERDECKER (1917, 1922, Literatur bei SCHAFER 1927) zurückgehenden Definition der apokrinen Sekretion. Ähnlich ist die entsprechende Darstellung von CHÈVREMONT (1956): «A chaque cycle sécrétoire, la partie apicale de la cellule s'ampute et tombe dans la lumière glandulaire, ou elle se désagrège plus ou moins.»

Vergleicht man diese Definitionen mit denen anderer Autoren, so ergeben sich mehr oder weniger auffallende Inkongruenzen der Begriffsinhalte. So schreibt LE GROS CLARK (1945): „The different modes of secretory discharge are in part related to the nature of the secretory substance. Viscous substances are not able to pass through the intact cell membrane, so that the latter is necessarily ruptured by their discharge. This is what occurs in apocrine glands.“ In einem Falle wird also unter apokriner Sekretion die Abschnürung eines sekrethaltigen Zellapex, im anderen die Entleerung des Sekrets durch Ruptur der Zellmembran verstanden.

Ein weiteres Beispiel für derartige Inkongruenzen ergibt sich aus der Nebeneinanderstellung der Definition der holokrinen Sekretion, die COPENHAVER und JOHNSON (1958), BLOOM (1957), HAM (1957) und STÖHR jr. (1951) geben. Während COPENHAVER und JOHNSON ebenso wie BLOOM und HAM in der Feststellung übereinstimmen, daß sich die Drüsenzellen mit Sekretionsprodukten beladen (BLOOM: „Products accumulated within the cell body“) und dann als abgestorbenes Ganzes ausgestoßen werden, wandelt sich nach STÖHR jr. (1951) die ganze „verfettende“ Zelle in Sekret um, eine Auffassung, die auch ZETKIN und SCHALDACH (1956) in ihrer Medizinischen Terminologie teilen. Im ersteren Falle wird also die Produktion eines Sekretes durch die Aktivität des Zytoplasmas vorausgesetzt, deren Begleiterscheinung der Zelltod ist, im letzteren eine Umwandlung der Zelle unter Verfettung, worunter der Pathologe alles andere als einen Sekretionsprozeß versteht (vgl. BÜCHNER 1959). COWDRY (1950) spricht geradezu von einer „fatal fatty degeneration“ der Talgdrüsenzelle, WATZKA (1957) von „Sekretbildung durch Zelluntergang“. Die fettige Degeneration ist kein Vorgang, der

als normales Geschehen mit dem Ziel der Gewinnung eines Nutstoffes in den Funktionsplan des Organismus gehört.

Diese die sog. holokrine und apokrine Sekretion betreffenden Beispiele mögen genügen, um ein Streiflicht auf die Unschärfe der Begriffe zu werfen, deren sich die Histologen zu bedienen pflegen, um die Phänomene der Sekretion in ein auf RANVIER (1887, merokrine, holokrine Drüsen) und SCHIEFFERDECKER (1917, 1922, zitiert nach SCHAFER 1927) zurückgehendes Schema einzufangen. Begründet ist diese Unzulänglichkeit in dem Umstand, daß die Lichtmikroskopie — in deren Ära die Terminologie der Sekretionsmorphologie entstand — keine widerspruchsfreien Befunde und damit eindeutigen, einmütig akzeptierbaren Schlüsse auf die beim Sekretionsprozeß sich abspielenden Vorgänge gestattete. Es sei in diesem Zusammenhang nur noch einmal auf die Angaben der Lichtmikroskopiker über die Absonderung der Milch erinnert, die nach Ansicht des einen Forschers auf der Abschürung eines fetthaltigen Apex, nach der Ansicht des anderen auf der Freisetzung eines Fetttropfens unter Ruptur der Zelloberfläche (s. auch LE GROS CLARK 1945) beruhen sollte, während die Frage nach dem Mechanismus der Abgabe des Kaseins und des Milchplasmas offenbar gar nicht gestellt wurde.

Unter diesen Umständen erscheint es lohnend, die bisherigen, an Drüsen mit angeblich verschiedenen Sekretionsmodi getroffenen Feststellungen der Elektronenmikroskopiker zu sichten und zu fragen, ob und in welchem Umfange sie mit der Klassifizierung der Sekretionsweisen in Einklang stehen, die bisher zu den obligatorischen Elementen unserer Lehrbücher gehört. Die Tatsache der uns immer stärker bewußt werdenden Übereinstimmung im Grundplan der Molekulararchitektur von Zellen mit höchst verschiedenen biologischen Eigenschaften legt es nahe, auch die an den Epithelzellen intersekreterischer Drüsen gewonnenen Beobachtungen in den Kreis der Betrachtung einzubeziehen.

Nach den bisher vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen an merokrinen Drüsen, vor allem am Pankreas, entsteht das Sekret im Zytoplasma in Form kleiner Tröpfchen oder Granula, und zwar in enger, im einzelnen noch nicht geklärter Beziehung zum Golgisystem. PALAY (1958), dem wir eine sorgfältige kritische Prüfung des Schrifttums verdanken, weist darauf hin, daß zwischen den elektronenmikroskopischen Bildern der merokrinen und endokrinen Drüsenzellen — z. B. der Adenohypophyse und Thyreoidea (s. auch WISSIG 1960) — eine bemerkenswerte Ähnlichkeit besteht. Auch in den endokrinen Zellen kommt es zur Bildung von Granula im Golgisystem. Die Frage, ob die Sekretentstehung in anderen endokrinen Drüsen in anderer Weise abläuft, z. B. etwa bei der Steroidbildung in der Nebennierenrinde unter Beteiligung der Mitochondrien, bedarf nach PALAY noch der Klärung. Auch hier jedoch kommt es zur Entstehung von Sekret in Form kleiner Granula. In den sekretorischen Neuronen des Zwischenhirn-Hypophysensystems werden Granula gebildet (PALAY 1955, 1957, BARGMANN 1958), deren Entstehungsweise noch nicht geklärt werden konnte (Ergastoplasma? Golgikomplex?): stellenweise können sich diese sog. Elementargranula unter Konfluenz zu tropfigen, auch lichtmikroskopisch sichtbaren Komplexen vereinigen (BARGMANN, KNOOP und THIEL 1957).

Über die Morphologie der Sekretbildung in einer *apokrinen Drüse* geben einmal die in den verschiedenen Studien über die Milchsekretion mitgeteilten Beobachtungen einige Anhaltspunkte. Der geformte Proteinanteil der Milch,

die Kaseinpartikel, treten im Golgiapparat in Gestalt der gleichen Granula auf, die im Milchplasma verteilt sind. Das MilCHFett wird — anscheinend in enger Beziehung zum Ergastoplasma — in Form von Tröpfchen gebildet, die zu den größeren Milchkügelchen heranwachsen. Ferner berichten KUROSUMI, KITAMURA und TIYIMA (1959) über den elektronenmikroskopischen Nachweis von Sekretgranula in den Zellen der apokrinen Achseldrüse des Menschen. Aus diesen Granula sollen Vakuolen hervorgehen, die sich im Zellapex anreichern. Nach Auffassung der Autoren wird das Sekret vor der Extrusion verflüssigt. Vor der Sekretabgabe kommt es zur Füllung des stark aufgetriebenen Zellapex („apocrine secretory projection“) mit einer strukturarmen Substanz von geringer Dichte, über deren Abgabe keine Mitteilungen gemacht werden. Man kann jedoch den Daten von KUROSUMI u. Mitarb. entnehmen, daß die Sekretbildung auch in Duftdrüsen offenbar nicht auf dem Zerfall amputierten Zytoplasmas beruht (vgl. hierzu das Zitat aus CHÉVREMONT 1956 auf S. 563).

Auch in den sog. *holokrinen Drüsenzellen* entstehen im Bereich des hier besonders kompliziert strukturierten Golgikomplexes (PALAY 1958) Sekrettröpfchen, bei deren Heranwachsen zu Lipideinschlüssen das sie umgebende Zytoplasma auf einen immer enger werdenden Raum beschränkt wird (vgl. hierzu auch die Abbildung bei KUROSUMI, KITAMURA und KANO 1960).

Vergleicht man die hier erwähnten, an den Zellen sehr verschiedenartiger Drüsen gewonnenen Befunde miteinander, so stellt man Übereinstimmung im morphologischen Verhalten insofern fest, als die Sekrete *in jedem Fall im Zytoplasma in Form von Granula oder Tröpfchen ausgearbeitet werden*. Welche Zellstrukturen — seien es Golgiapparat, Ergastoplasma und im Einzelfalle auch Mitochondrien — bei der Sekretbereitung die führende Rolle spielen bzw. wie sie zusammenarbeiten, mag von Fall zu Fall, d.h. je nach chemischer Beschaffenheit des Zellproduktes, verschieden sein. Anhaltspunkte für ein unmittelbares Eingehen von Zytoplasma in das Sekret, für eine einfache Umwandlung von Zytoplasma in Sekret, haben sich bisher nicht ergeben (s. auch KUROSUMI u. Mitarb. 1959, Achseldrüsen). Von letzterer ist jedoch, insbesondere im Falle der holokrinen Sekretion, immer wieder die Rede gewesen (vgl. STÖHR jr., COWDRY, ZEIGER, s. unten). Die Möglichkeit einer Ausstoßung von Zytoplasmapartikeln im Zuge der Stoffabgabe soll damit nicht bestritten werden. Soweit sie tatsächlich vorkommt, ist jedoch erst zu prüfen, ob abgestoßenen Zytoplasmateilchen eine funktionelle Bedeutung zukommt; für die Zytoplasmamembranen der MilCHFettkügelchen z.B., die als Erhalter der Individualität der Fetttröpfchen gelten und Fermente enthalten, wird dies mit guten Gründen behauptet. Die Bezeichnung „Sekret“ sollte jedoch den intrazellulär synthetisierten Substanzen vorbehalten bleiben.

Während sich die Morphologie der Sekretbereitung als weithin einheitlich erweist, bestehen auf dem Gebiete der *Extrusionsmorphologie* erhebliche Unterschiede von Zellart zu Zellart, soweit sich der Vorgang der Sekretabgabe bis jetzt überhaupt hat klären lassen. Im Falle der endokrinen Drüsen ist es z.B. eine offene Frage, ob granulär vorgeformte Sekrete die Zelle verlassen bzw. ob und auf welche Weise etwa die Granula ihre Wirkstoffkomponente abgeben. Wie das granulär oder tropfig vorgeformte Sekret die exokrinen Zellen verläßt, ist je nach Sekretart verschieden. Die Becherzelle gibt die von ihr bereiteten, später



zusammenfließenden Schleimtröpfchen nach PALAY (1958) unter Bersten des apikalen Plasmalemmas ab. Wegen dieses „outpouring of the apical region“ hält PALAY die Zuordnung dieser gemeinhin als merokrin geltenden Zelle zu den apokrinen für gerechtfertigt, wobei er einen lichtmikroskopisch begründeten Begriff der Deutung des elektronenmikroskopischen Befundes unterlegt. Daß exokrine Drüsenzellen Proteingranula als reifes Sekret abgeben, zeigt das Beispiel der Milchdrüse; zugleich scheidet diese Zelle Fetttropfen ab, die von einem Zytoplasmafilm umhüllt werden. Die sog. apokrine Drüsenzelle der Glandula mammaria verhält sich also hinsichtlich der Proteinabgabe wie eine bisher auf Grund ihres lichtmikroskopischen Verhaltens als merokrin bezeichnete Epithelzelle, während die Abgabe eines membranumhüllten Fetttropfens — soweit wir sehen — überhaupt keine Parallele hat. Das Sekret der holokrinen Zellen verläßt die Drüse zusammen mit der Bildungszelle, deren Tod, wie gesagt, eine *Begleiterscheinung der Sekretbereitung* ist, aber nicht diese selbst bedeutet. Wenn LE GROS CLARK (1945) diesen Vorgang als „extravagant method of secretion“ bezeichnet, so gilt das in der Tat im Hinblick auf die Art und Weise des „discharge“ und nicht der *Sekretbildung*.

Abschließend stellen wir fest: In dem gebräuchlichen Schema der Sekretions- bzw. Extrusionsmorphologie findet die sog. apokrine Sekretion nach unserer Auffassung keinen Raum, da ihre auf Grund lichtmikroskopischer Studien seit Vorantritt SCHIEFFERDECKERS formulierten Kriterien der elektronenmikroskopischen Nachprüfung nicht standhalten. An der von RANVIER vorgeschlagenen systematischen Einteilung in merokrine und holokrine Drüsen kann man nur unter der Voraussetzung festhalten, daß sie nicht mit unzutreffenden Aussagen über die Art der *Sekretentstehung* belastet wird. Eine solche Aussage ist expressis verbis vorgetragen in den Formulierungen von COWDRY (1950) und STÖHR jr. (1951), wonach die holokrine Talgbildung auf einer fettigen Degeneration bzw. Verfettung der Drüsenzelle beruht<sup>1</sup>, ferner von ZEIGER (1948), derzufolge sich die ganze Zelle in spezifischer Weise in Sekret umwandelt. Man sollte sich darauf beschränken, die Drüsen in solche einzuteilen, deren Zellen bei der Sekretion erhalten bleiben und solche, deren Elemente im Ablauf der Sekretbildung zugrunde gehen; dies entspräche der ursprünglichen Konzeption der histologischen Drüsen-systematik.

### Summary

1. An electron-microscopical study of the mammary gland of lactating mice and golden hamsters was carried out in order to obtain new evidence on the secretion of milk and to understand some discrepancies between earlier findings of BARGMANN and KNOOP (1959) in rats and of HOLLMANN (1959) in mice.

In both species, mice and golden hamsters, the results on the formation and extrusion of the *protein particles* are similar to those previously obtained in the rat. The protein particles are formed in Golgi vacuoles, which are transported to the luminal side of the cell. The content of these vacuoles is discharged into the acinar lumen.

<sup>1</sup> Möglicherweise reichen die Wurzeln der zählebigen Degenerations- bzw. Verfettungstheorie der holokrinen Sekretion in VIRCHOWS „Cellularpathologie“ (1885). Hier wird nämlich in dem Kapitel über „Passive Vorgänge, Fettige Degeneration“ die „Schmeersekretion“, übrigens ebenso wie die Milchabscheidung, auf eine „Fettmetamorphose“ zurückgeführt, bei der es zu einer Auflösung der Zellen im Ablauf einer physiologischen Nekrobiose komme.

Within the Golgi vacuoles containing protein particles there is always a considerable amount of seemingly empty space; in addition, there is some accumulation of extremely fine coagulated material. When discharged, these coagulations are believed to constitute part of the *milk plasm*.

The formation of *fat droplets* was invariably found to be related to the ergastoplasm and not to the Golgi apparatus. In mice as well as in golden hamsters the fat droplets are transported to the apical part of the cell, where they protrude the plasmamembrane into the lumen. Eventually, each fat droplet is pinched off with a thin cytoplasmic envelope, the so called fat droplet membrane. Release of droplets by rupture of the plasmamembrane, as described by HOLLMANN (1959) in mice, was not seen in our material and is believed to be due to an artifact.

In the lactating golden hamster mammary gland cells, big fat droplets sometimes deeply indent the nuclear membrane from the cytoplasmic side, thus giving rise in some sectional planes to the misleading impression of big nuclear inclusions. Apart from these droplets, which are always surrounded by the nuclear membrane, sections of the glandular cell nuclei often show a number of smaller fat droplets which are not surrounded by a membrane. These small and inconspicuous droplets are believed to be true nuclear inclusions.

During lactation the glandular cells are provided with numerous *microvilli*; in the golden hamster there are roughly 10—20, and in the mouse about 25 microvilli per square  $\mu$ . The increase in cell surface brought about by the microvilli is thought to be related to *resorptive processes* which were first suggested by GRYNFELTT (1937) and proved to exist by AZIMOV (1959).

2. The electron-microscopical findings on the secretion of milk as well as findings on other types of glandular cells are discussed in a broader frame with respect to their bearing on the *systematics of secretion* in general. It is shown that the term "apocrine secretion" can no longer be retained. In accordance with the classical concept of RANVIER, glands should be subdivided into two groups only. In the one group, the glandular cells survive the formation of their secretory products, whereas in the other group the cytoplasm of the glandular cells is completely exhausted so that the cells cannot survive more than one secretory cycle. The terms "merocrine" and "holocrine" may be appropriate, but one must be aware of the fact that the essential features of the formation of secretory products in holocrine glands are not entirely different from those in other types of glands and that the term "degeneration" is misleading when used in this connection.

### Literatur

- AZIMOV, G. J.: Some processes accompanying the secretion of milk. In: XV. Internat. Dairy Congr. Vol. 1, pp. 15—19, London 1959.
- BARGMANN, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Neurohypophyse. In: 2. Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund 1957. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- Über die Bildung von Milchfett und Milcheiweiß. *Milchwissenschaft* **14**, 99—103 (1959).
- , u. A. KNOOP: Über die Morphologie der Milchsekretion. Licht- und elektronenmikroskopische Studien an der Milchdrüse der Ratte. *Z. Zellforsch.* **49**, 344—388 (1959).
- u. A. THIEL: Elektronenmikroskopische Studie an der Neurohypophyse von *Tropidonotus natrix*. *Z. Zellforsch.* **47**, 114—126 (1957).
- BÜCHNER, FR.: Allgemeine Pathologie, 3. Aufl. München u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1959.
- CHÉVREMONT, M.: Notions de cytologie et histologie. Liège: Desoer 1956.



- COWDRY, E. V.: A textbook of histology, 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger 1950.
- EHRENBRAND, F., u. E. LINDNER: Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Fetttropfen in den Zellkernen der laktierenden Mamma des Goldhamsters. 9. Tagung d. Dtsch. Ges. f. Elektronenmikroskopie, Freiburg, 18.—21. Okt. 1959, Programm S. 12.
- GRYNFELT, M. J.: Etude de processus cytologique de la sécrétion mammaire. Arch. Anat. micr. **33**, 177—208 (1937).
- HAM, A. W.: Histology, 3th ed. London 1957.
- HOLLMANN, K.-H.: L'ultrastructure de la glande mammaire normale de la souris en lactation. J. ultrastruct. Res. **2**, 423—443 (1959).
- La cytologie de la glande mammaire au microscope électronique. Bull. Soc. roy. belge Gynéc. Obstet. **30**, 353—358 (1960).
- KNOOP, E., u. A. WORTMANN: Zur Größenverteilung der Caseinteilchen in Kuhmilch, Ziegenmilch und Frauenmilch. Milchwissenschaft **15**, 273—281 (1960).
- KUROSUMI, K., T. KITAMURA and K. KANO: Electron microscopy of the human sebaceous gland. Arch. hist. japon. **20**, 235—246 (1960).
- and T. TIYIMA: Electron microscope studies on the human axillary apocrine sweat glands. Arch. hist. japon. **16**, 523—566 (1959).
- LE GROS CLARK, W. E.: The tissues of the body, 2nd ed. Oxford: Clarendon Press 1945.
- MAXIMOW, A., and W. BLOOM: A textbook of histology, 7th ed. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company 1957.
- PALAY, S. L.: An electron-microscope study of the neurohypophysis in normal hydrated and dehydrated rats. Anat. Rec. **121**, 348 (1955).
- The fine structure of the neurohypophysis. In: Progress in neurobiology, vol. II, ed. by H. WAELSCH. New York: P. B. Hoeber 1957.
- Frontiers in cytology. New Haven: Yale Univ. Press 1958.
- SCHAFER, J.: Das Epithelgewebe. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. II/1, herausgeg. von W. v. MÖLLENDORFF. Berlin: Springer 1927.
- STÖHR jr., PH.: Lehrbuch der Histologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.
- VIRCHOW, R.: Die Cellularpathologie. Berlin 1958 (benutzt wurde die 4. Aufl. 1871).
- WATZKA, M.: Kurzlehrbuch der Histologie und mikroskopischen Anatomie. Stuttgart: K. F. Schattauer 1957.
- WELLINGS, S. R., K. B. DEOME and D. R. PITEKKA: Electron microscopy of milk secretion in the mammary gland of the C3H/Crgl mouse. I. Cytomorphology of the prelactating and the lactating gland. J. nat. Cancer Inst. **25**, 393—422 (1960).
- , B. W. GRUNBAUM and K. B. DEOME: Electron microscopy of milk secretion in the mammary gland of the C3H/Crgl mouse. II. Identification of fat and protein particles in milk and in tissue. J. nat. Cancer Inst. **25**, 423—438 (1960).
- WISSIG, St. L.: The anatomy of secretion in the follicular cells of the thyroid gland. I. The fine structure of the gland in the normal rat. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 419—432 (1960).
- ZEIGER, K.: Histologie. Grundzüge einer Vorlesung. Hamburg: R. Hermes 1948.
- ZETKIN, M., u. H. SCHALDACH: Wörterbuch der Medizin. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit 1956.

Professor Dr. W. BARGMANN, Anatomisches Institut der Universität Kiel,  
Neue Universität, Eingang F 1



# Aufnahmebedingungen

## I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.
2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

## II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierter Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.
2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargestellt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonebildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonezeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z. B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. *Z. Zellforsch.* 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzelne Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.



# Markhaltige Faserverbindungen im Hirnstamm der Katze

Mit Ausführungen über die funktionelle und klinische Bedeutung der  
geschilderten Strukturen

Von SANDRO BÜRGI,

Professor für innere Medizin, bes. Neurologie an der Universität Bern,

und VERENA M. BUCHER,

Physiologisches Institut der Universität Zürich, Mitarbeiterin für den anatomischen Teil

Mit einem Geleitwort von Professor Dr. W. R. HESS

(Monographien aus dem Gesamtgebiet der Neurologie und Psychiatrie. Herausgegeben  
von M. MÜLLER, Bern · H. SPATZ, Gießen · P. VOGEL, Heidelberg. Heft 87)

Mit 49 Abbildungen. IV, 127 Seiten Gr.-8°. 1960. DM 39,60

## INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung · Allgemeine Vorbemerkungen · Rhinencephale Verbindungen: Verbindungen des mamillären Systems, des habenulären Systems. Einige weitere Verbindungen · Das Tectum opticum und die Verbindungen vorwiegend optischer Bedeutung: Struktur und allgemeiner Faserverlauf. Afferenzen. Efferenzen. Physiologische Experimente. Mögliche Bedeutung beim Menschen · Das Tectum acusticum (Colliculus inferior) und die Verbindungen vorwiegend akustischer Bedeutung: Struktur. Afferenzen. Efferenzen. Physiologische Bedeutung · Das System der Decussatio supraoptica ventralis (Meynertsche und Guddensche Commissur) · Die Area praetectalis · Die zentralen Haubenbahnen: Fasc. thalamopraetecto-tegmentalis und Fasc. tegmento-olivaris. Die Frage der zentralen Haubenbahn · Commissura posterior, hinteres Längsbündel und die Verbindungen vestibulärer bzw. vestibulo-optischer Bedeutung: Die Kerne der hinteren Commissur. Commissura posterior und Efferenzen aus dem Nucl. com. post. Fasc. longitudinalis medialis. Physiologische Bedeutung dieser Strukturen · Der Fasc. decussationis supraopticae dorsalis (GANSER) · Verbindungen der Basalganglien und des Subthalamus: Afferenzen des Striopallidum. Efferenzen des Striopallidum (insb. Komplex der Ansa lenticularis und deren Fortsetzung). Allgemeine morphologische Betrachtung. Physiologische Bedeutung · Die Bahnen der Sensibilität: Lemniscus medialis und Lemniscus trigeminalis. Wallenbergbündel und Fasc. spinothalamicus. Weitere Projektionen aufsteigender Systeme. Mesencephale Trigeminiwurzel und Probstsches Bündel. Physiologische Bedeutung · Kleinhirnverbindungen: Afferenzen. Efferenzen. Insb. Brachium conjunctivum. Physiologische Bedeutung · Markhaltige Fasern in vegetativen Strukturen: Befunde. Besprechung · Schlußwort · Verzeichnis der besprochenen Strukturen · Literaturverzeichnis · Jeder Hauptabschnitt enthält eine Zusammenfassung in englischer Sprache.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG